

**Caracterización funcional de genes involucrados en la germinación
mediada por luz y temperatura en semillas de *Arabidopsis thaliana*.**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Rocío Soledad Tognacca

Licenciada en Ciencias Biológicas - Universidad de Belgrano - 2011

Lugar de trabajo: IFEVA – Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires y
CONICET.



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Javier Francisco Botto

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Rodolfo Augusto Sánchez

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD en Fisiología Vegetal (Universidad de California)

JURADO DE TESIS

Director de Tesis

Javier Francisco Botto

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Jurado

Pablo Cerdán

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Jurado

Ambrosio Rubén Bottini

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Jurado

Ana Edit Vigliocco

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Fecha de defensa de la tesis: 09/03/2018

DEDICATORIA.

A mis padres y hermanos, porque sin ellos no sería quien soy.

AGRADECIMIENTOS.

Qué difícil se hace la parte de los agradecimientos.... Por quién empezar, no? Fue mucha la gente con la que compartí estos largos años doctorales.

Quiero darle las gracias a Javier, mi director, por haber sido una parte importante que permitió que esta tesis llegara a buen puerto: un “pilón de hojas” que sin dudas demuestran todo el esfuerzo personal y profesional que hay detrás. Gracias por la enorme paciencia que me tuviste en estas últimas semanas y por haberme permitido incursionar en nuevas colaboraciones con diferentes grupos de investigación.

A Rodolfo Sánchez, mi consejero de estudios, por haber estado siempre que lo necesité.

No puedo dejar de agradecer a Marcelo Yanovsky y su grupo, porque gracias a ellos el capítulo de *splicing* comenzó a gestarse. Agradezco en especial a Esteban, por la excelente predisposición que tuvo conmigo para darme una mano con los análisis bioinformáticos. Y ya que hablo de *splicing*, no puedo dejar de mencionar al “Splicing Team”: Lucas y Petry. Gracias Lucas por coparte con la extracciones de ARN de las semillas, impecables! Petry! Un gran ejemplo a seguir, siempre con la mejor de las ondas y la mayor de las paciencias para enseñarme lo “poco o mucho” que sé de *splicing*. Gracias por las lecturas y los aportes que hiciste a la tesis, en especial al capítulo 2. Vamos por más!

A Vero Arana y Maxi por aceptar y permitir formar parte de su proyecto. Gracias Vero por la semana que compartimos en el IFEVA, a pesar de que fue una semana a pura real time, aprendí mucho de vos.

A Sil, una amiga que me llevo del Labo Grande. Porque con ella aprendí y compartí muchas cosas desde mis años como tesinista allá por el 2009 y durante parte de mis años doctorales. Por haber estado siempre, dentro y fuera del labo. Por los momentos felices y los no tanto compartidos, por las miles de anécdotas que tenemos fruto de los largos viajes de regreso al conu! Gracias Sil!

Y ya que nombro al Labo Grande no puedo dejar de agradecer a todos los chicos! Gracias por la enorme paciencia que me tuvieron estos años, por aguantar mis locuras, mis risas y mis llantos. Son una parte importante para que esta tesis llegara a su fin, sin ustedes el camino hubiese sido aún más difícil. Gracias por “los pulsitos” que salvaron tantos de mis experimentos. Por la buena onda, los almuerzos inolvidables y los momentos compartidos. Gracias especiales a la Dra. Sellaró! Por estar siempre, sobre todo a final de camino, cuando necesitaba una palabra de aliento, y una lectura de tesis urgente! Gracias porque siempre tuviste la mejor de las ondas conmigo y mucha paciencia. Gracias Dr. Pipa Cagnola por los momentos compartidos, sobre todo en esta última etapa, por ayudarme con la tesis, con la parte administrativa y por la paciencia que me tuviste! Al grupo Botto! Millón de gracias! En especial a Yesi, Tai, Fabi, Jime y Maite, por los años compartidos, por la onda que le ponen para trabajar día y día, por la infinita paciencia que me tuvieron, por todo! Gracias Cris por aguantarme todos estos años!!!! Por estar cuando te necesité, otro amigo que me llevo de este camino! Mile, gracias por la buena onda! A Manu, gracias por enseñarme mil cosas, porque siempre estuviste para despejar mis dudas, y por la musicalización del labo, en especial la de los viernes! Al grupo Casal, gracias por los momentos compartidos! A las Ifevas: Tai,

Maite, Sofi, Orne, Marian, Viky y Ely, qué puedo decirles, no? Amigas que me llevo de esta experiencia, miles de momentos compartidos dentro y fuera del labo, porque siempre tuvieron una palabra de aliento conmigo, por estar siempre, con la mejor de las ondas! Por las risas, logros y frustraciones compartidas! Me llevo los mejores recuerdos de todas ustedes chicas!

A mis amigas, en especial a Cin y Lu, por haber recorrido este camino juntas, por la amistad de tantos años, por el empuje y la garra, por estar siempre, por los momentos compartidos, por todo!

Gracias enormes a todos !!!

But seeds are invisible.
They sleep deep in the heart of the earth's darkness,
until someone among them is seized with the desire to awaken.
Then this little seed will stretch itself and begin - timidly at first -
to push a charming little sprig inoffensively upward toward the sun.
Antoine de St. Exupéry, *Le petit prince* (1943).

DECLARACIÓN.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Lic. Rocío Soledad Tognacca.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.

Arana MV*, **Tognacca RS***, Estravis-Barcalá M, Sánchez RA, Botto JF. 2017. Physiological and molecular mechanisms underlying the integration of light and temperature cues in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell & Environment*. doi: 10.1111/pce.13076.

* Ambos autores contribuyeron de igual manera.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DECLARACIÓN.....	vii
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
CAPÍTULO 1.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.2. EL ESTADO DE DORMICIÓN EN LAS SEMILLAS.....	2
1.2.1. Significado ecológico de la dormición.....	3
1.3. <i>DOG1 (DELAY OF GERMINATION 1)</i> COMO REGULADOR DE LA DORMICIÓN DE LAS SEMILLAS.	4
1.4. LA FUNCIÓN DE LAS HORMONAS EN LA DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.....	5
1.4.1. Ácido Abscísico.....	6
1.4.2. Giberelinas.	7
1.5. LA TEMPERATURA Y LA SALIDA DE LA DORMICIÓN.	9
1.6. LA LUZ Y LA SALIDA DE LA DORMICIÓN.	9
1.6.1. Características fotobiológicas, genéticas y moleculares de los fitocromos.....	10
1.6.2. Síntesis de los fitocromos en las semillas.	12
1.6.3. Modo de acción de los fitocromos.	12
1.6.4. Importancia ecológica de las respuestas a la luz en las semillas.	14
1.7. MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS A LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN POR LUZ.....	16

1.8. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL DE <i>SPLICING</i> DEL ARN MENSAJERO.	18
1.8.1. El dogma central de la biología.	19
1.8.2. Procesamiento del precursor de ARNm.	19
1.8.3. Las plantas y el <i>splicing</i> alternativo.	¡Error! Marcador no definido.
1.8.4. Ejemplos de genes asociados a la dormición y germinación de las semillas que hacen <i>splicing</i> alternativo.	23
1.9. EL RELOJ CIRCADIANO DE LAS PLANTAS COMO INTEGRADOR DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS Y TÉRMICAS EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.	25
1.10. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA TESIS.	28
CAPÍTULO 2.	30
2.1. INTRODUCCIÓN.	31
2.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.	35
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.	36
2.4. RESULTADOS.	40
2.4.1. Perfil transcripcional inducido por luz en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	40
2.4.2. Clasificación de los genes diferencialmente <i>spliceados</i> por luz.	43
2.4.3. Clasificación Ontológica de los genes que presentan <i>splicing</i> alternativo inducido por luz.	44
2.4.4. Meta-análisis entre eventos de <i>splicing</i> alternativo inducidos por luz y transcriptomas asociados a otros procesos fisiológicos.	46
2.4.5. Validación de algunos eventos de <i>splicing</i> alternativo mediante PCR semi-cuantitativa en semillas salvajes Col-0 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	50
2.4.6. Rol de los fitocromos en el patrón de <i>splicing</i> alternativo en semillas embebidas de <i>Arabidopsis</i> .	52
2.4.7. Sensibilidad a la luz en semillas que sobre-expresan el gen <i>RS31</i> .	55
2.5. DISCUSIÓN.	57
2.6. CONCLUSIONES.	59
CAPÍTULO 3.	60
3.1. INTRODUCCIÓN.	61
3.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.	64
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.	65
3.4. RESULTADOS.	69
SECCIÓN 3.4.1.	69
3.4.1.1. Análisis de genómica funcional de factores de transcripción que controlan la germinación inducida por luz.	69
3.4.1.2. <i>ATHB2</i> es un gen que reprime la germinación en luz blanca.	70

3.4.1.3. <i>ATHB2</i> inhibe la germinación a la luz a través de la vía de señalización del ABA....	72
3.4.1.4. La expresión de genes vinculados al metabolismo y señalización del ABA están desregulados en las semillas mutantes <i>athb2-1</i>	73
SECCIÓN 3.4.2.	76
3.4.2.1 Perfil hormonal asociado a la germinación inducida por luz R: relevancia de las auxinas.....	76
3.4.2.2. Identificación de componentes auxínicos asociados a las vías de señalización por luz.	78
3.4.2.3. La germinación inducida por luz altera los niveles de auxinas en las semillas.	79
3.4.2.4. La germinación inducida por luz R es inhibida por auxinas exógenas e involucra procesos de transporte de auxinas.	81
3.4.2.5. Los transportadores de auxinas PIN3, PIN7 y AUX1 contra-restan los efectos inhibitorios de la germinación por ABA.	84
3.5. DISCUSIÓN.	86
3.6. CONCLUSIONES.	89
CAPÍTULO 4.	90
4.1. INTRODUCCIÓN.....	92
4.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.	94
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
4.4. RESULTADOS.....	100
4.4.1. Efecto de los ciclos diarios de temperatura sobre la germinación de semillas <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
4.4.2. Relación entre ciclos diarios de temperatura y genes de la germinación en semillas Col-0.....	102
4.4.3. Relación entre ciclos diarios de temperatura y genes del oscilador central del reloj circadiano durante la germinación.	103
4.4.4. Rol de DOG1 en respuesta a ciclos diarios de temperatura.	106
4.5. DISCUSIÓN.	110
4.6. CONCLUSIONES.	112
CAPÍTULO 5.	113
5.1. INTRODUCCIÓN.....	114
5.2. RESULTADOS PRINCIPALES Y EVALUACIÓN DE LAS HIPÓTESIS DE TRABAJO.	114
5.3. PERSPECTIVAS SOBRE FUTURAS APROXIMACIONES EXPERIMENTALES.	115
5.4. CONTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS AL MARCO TEÓRICO DEL PROBLEMA.....	116
5.5. CONTRIBUCIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y POSIBLES APLICACIONES PRÁCTICAS.....	118
5.6. CONCLUSIONES GENERALES.....	119
CAPÍTULO 6.	120

BIBLIOGRAFÍA.....	120
CAPÍTULO 7.....	143
ANEXOS.	143
ANEXOS CAPÍTULO 2.	143
ANEXOS CAPÍTULO 3.	146
ANEXOS CAPÍTULO 4.	237

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 2.	30
Tabla 2.4.4.1. Distintos procesos fisiológicos comparten parcialmente eventos de <i>splicing</i> alternativo.	47
Tabla 2.4.4.2. Genes comunes compartidos en distintos procesos fisiológicos.	49
ANEXOS CAPÍTULO 2.	214
Tabla 2.4.1. Análisis de enriquecimiento de las GO.	145
Tabla 2.4.5.1. Listado de <i>primers</i> utilizados para medir isoformas de <i>splicing</i> alternativo.	215
ANEXOS CAPÍTULO 3.	216
Tabla Anexo 3.4.1.1.1.A. Listado de factores de transcripción Down-regulados en R.	217
Tabla Anexo 3.4.1.1.1.B. Listado de factores de transcripción Up-regulados en R.	222
Tabla Anexo 3.4.2.1.1.A. Listado de genes de auxinas Down-regulados en R.	227
Tabla Anexo 3.4.2.1.1.B. Listado de genes de auxinas Up-regulados en R.	228
Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A. Meta-análisis de transcriptomas de genes Down-regulados en R (se resaltan en color los genes en común de los transcriptomas con los de esta tesis).	229
Tabla Anexo 3.4.2.2.1.B. Meta-análisis de transcriptomas de genes Up-regulados en R (se resaltan en color los genes en común de los transcriptomas con los de esta tesis).	231
Tabla 3.4.1.4. Listado de <i>primers</i> utilizados para medir niveles de expresión por qRT-PCR.	234
ANEXOS CAPÍTULO 4.	237
Tabla 4.4.2.1. Listado de <i>primers</i> utilizados para medir niveles de expresión por qRT-PCR.	238

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.	1
Fig.1.6. Espectro de luz solar y principales fotorreceptores en plantas.	10
Fig.1.6.1.1. Características de los fitocromos.	11
Fig.1.6.3.1. Modos de acción de los fitocromos.	14
Fig.1.7.1. Modelo molecular de los eventos que conducen a la germinación en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	17
Fig.1.8.3.1. Aumento en la frecuencia de ocurrencia del <i>splicing</i> alternativo en <i>Arabidopsis thaliana</i> a lo largo del tiempo.	21
Fig.1.8.3.2. Tipos de eventos de <i>splicing</i> alternativo en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	22
Fig.1.8.4.1. Variantes de <i>splicing</i> alternativo de DOG1 en <i>Arbidopsis</i> .	24
Fig.1.8.4.2. Variantes de <i>splicing</i> alternativo de <i>PIF6</i> en <i>Arbidopsis</i> .	25
Fig.1.9.1. Modelo generalizado del oscilador central.	26
Fig.1.9.2. Modelo del reloj circadiano de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	27
CAPÍTULO 2.	30
Fig.2.1.1. Regulación del SA y su impacto durante el desarrollo de las plantas.	33
Fig. 2.4.1.1. La germinación es inducida por un pulso de luz roja en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	40
Fig. 2.4.1.2. Genes diferencialmente expresados en respuesta a la luz roja.	41
Fig. 2.4.1.3. Clasificación Ontológica.	42
Fig. 2.4.2.1. Patrones cuantitativos de expresión de SA y de expresión génica en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> inducidas a germinar por luz R.	44
Fig. 2.4.3.1. Análisis de enriquecimiento de las GO.	46
Fig. 2.4.4.1. Eventos de <i>splicing</i> alternativo conservados durante distintas etapas del desarrollo de las plantas.	48
Fig. 2.4.4.2. Eventos de <i>splicing</i> alternativo entre semillas en desarrollo, semillas embebidas y plántulas.	50
Fig. 2.4.5.1. Validación de genes que presentan <i>splicing</i> alternativo mediado por luz.	51
Fig. 2.4.6.1. La luz R promueve la germinación de semillas Col-0.	52
Fig. 2.4.6.2. Rol de los fitocromos sobre el SA de algunos genes.	53

Fig. 2.4.6.3. Rol de los fitocromos en la vía de señalización lumínica que altera la abundancia relativa de isoformas de algunos genes.	55
Fig. 2.4.7.1. La sobre-expresión de <i>RS31</i> modifica la sensibilidad de las semillas a la luz. ..	56
CAPÍTULO 3.	60
Fig. 3.4.1.1.1. Factores de Transcripción diferencialmente expresados en respuesta a la luz R.	69
Fig. 3.4.1.1.2. Familias de Factores de Transcripción diferencialmente expresados en respuesta a la luz roja.	70
Fig. 3.4.1.2.1. <i>ATHB2</i> es un represor de la germinación.	71
Fig. 3.4.1.3.1. La ausencia de <i>ATHB2</i> modifica la sensibilidad de las semillas al ABA pero no a las GAs.	72
Fig. 3.4.1.4.1. <i>ATHB2</i> es un represor de la germinación.	73
Fig. 3.4.1.4.2. Niveles mayores de germinación de <i>atbh2-1</i> vs Col-0 correlacionan con una disminución en la expresión génica de reguladores negativos de la germinación.	75
Fig. 3.4.2.1.1. Genes diferencialmente expresados en respuesta a la luz R.	77
Fig. 3.4.2.1.2. Genes de auxinas diferencialmente expresados en respuesta a la luz roja.	78
Fig. 3.4.2.2.1. Meta-análisis de transcriptomas asociados a la promoción de la germinación por luz.	79
Fig. 3.4.2.3.1. La germinación es inducida por un pulso de luz R en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
Fig. 3.4.2.4.1. La promoción de la germinación por luz necesita del transporte de auxinas en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
Fig. 3.4.2.4.2. Efecto de la incubación prolongada con NPA sobre la germinación de las semillas.	84
Fig. 3.4.2.5.1. La inhibición de la germinación por ABA es contra-restada en presencia de PIN3, PIN7 y AUX1 en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
Fig. 3.5.1. Modelo de acción propuesto.	87
CAPÍTULO 4.	90
Fig. 4.4.1.1. Los ciclos diarios de temperatura promueven la germinación de las semillas en respuesta a la luz R a través de la acción exclusiva del phyB.	101
Fig. 4.4.2.1. Los ciclos diarios de temperatura promueven la expresión de genes involucrados en el metabolismo del ABA y las GA.	103
Fig. 4.4.3.1. La promoción de la germinación por ciclos diarios de temperatura requiere de la presencia de alelos funcionales <i>PRR7</i> y <i>TOC1</i>	105

Fig. 4.4.4.1. <i>DOG1</i> regula negativamente el efecto de los ciclos diarios de temperatura sobre la germinación.....	106
Fig. 4.4.4.2. Expresión de <i>PRR7</i> en semillas Col-0 y <i>dog1</i>	107
Fig. 4.4.4.3. Los ciclos diarios de temperatura disminuyen la expresión de la proteína DOG1.....	108
Fig. 4.4.4.4. Variación natural en respuesta a ciclos diarios de temperatura... ..	109
CAPÍTULO 7.	203
Fig. Anexo 3.4.1.1.1. Listado de genes ordenados por logFC.....	227
Fig. Anexo 3.4.1.3.1. Curva de respuesta a fluridona y paclobutrazol.....	235
Fig. Anexo 3.4.2.4.1. Efecto de la incubación prolongada con NPA sobre la germinación de las semillas.....	235
Fig. Anexo 3.5.2. Cinética de germinación de semillas embebidas en agar-agua.	236

ABREVIATURAS

- ✓ Arabidopsis: *Arabidopsis thaliana*
- ✓ ABA: ácido abscísico
- ✓ ABI: *ABA insensitive*
- ✓ ADN: ácido desoxirribonucleico
- ✓ ADNc: ADN copia
- ✓ ALT3'SS: sitios aceptores de *splicing*
- ✓ ALT5'SS: sitios dadores de *splicing*
- ✓ ARN: ácido ribonucleico
- ✓ ARNm: ARN mensajero
- ✓ CRY: criptocromo
- ✓ CVI: *Cape Verde Islands*
- ✓ CYP707A: *cytochrome P450*
- ✓ D. ferox: *Datura ferox*
- ✓ DELLA: proteína GRAS con dominio DELLA
- ✓ DOG1: *delay of germination 1*
- ✓ DPA: ácido dihidrofásico
- ✓ ES: salteado exónico
- ✓ FDR: False Discovery Rate
- ✓ GA: ácido giberélico
- ✓ GA_OX: *gibberellin oxidase*
- ✓ GAI: *gibberellic acid insensitive*
- ✓ GRAS: familia que agrupa (GAI, RGA, SCR)
- ✓ HIR: respuesta a alta irradiancia
- ✓ IR: retención intrónica
- ✓ LER: *Landsberg erecta*
- ✓ LFR: respuesta a bajo flujo de luz
- ✓ NCED: *nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*

- ✓ NMD: degradación mediada por codones de terminación prematuros
- ✓ PA: ácido faseico
- ✓ Pfr/P: relación entre la forma activa de los fitocromos y la cantidad total de cromoproteína
- ✓ Pfr: forma activa de los fitocromos que absorbe eficientemente luz rojo lejano
- ✓ PHOT: fototropina
- ✓ *PHY*: gen que codifica para la proteína de fitocromo
- ✓ phyA: fitocromo A
- ✓ phyB: fitocromo B
- ✓ PIF/PIL: factor que interacciona con los fitocromos
- ✓ PIR: Percent Intron Retention
- ✓ Pr: forma inactiva de los fitocromos que absorbe eficientemente luz roja
- ✓ PSI: Percent Spliced-In
- ✓ QTL: *quantitative trait locus*
- ✓ R: luz roja
- ✓ Rp: pulso de luz roja
- ✓ R:RL: relación rojo:rojo lejano
- ✓ RGA: *repressor of GA*
- ✓ RGL: *RGA-like*
- ✓ RL: luz rojo lejano
- ✓ RLp: pulso de luz rojo lejano
- ✓ SA: *splicing* alternativo
- ✓ SC: *splicing* constitutivo
- ✓ SLY: *sleepy1*
- ✓ SR: proteínas ricas en serina y arginina
- ✓ UVR-8: fotorreceptor de luz UV-B
- ✓ VLFR: respuesta a muy bajo flujo de luz

RESUMEN

La luz y las temperaturas alternadas son dos señales que promueven la salida de la dormición en las semillas de muchas especies. La germinación depende además de los cambios que se producen en los niveles hormonales, como las giberelinas y el ABA que promueven e inhiben el proceso, respectivamente. Si bien existen muchos niveles de regulación génica modulados por los fotorreceptores, no hay información disponible sobre la regulación a nivel de *splicing* del ARN mensajero por luz, aunque existen evidencias de su importancia en la regulación de varios procesos fisiológicos. En este trabajo caracterizamos el perfil transcripcional y post-transcripcional de semillas Col-0 irradiadas con luz R o RL y demostramos que el *splicing* alternativo es un mecanismo de control relevante que confiere un nivel adicional de regulación génica. Mediante aproximaciones fisiológicas y moleculares demostramos que el gen *ATHB2* es un regulador negativo de la germinación promovida por el fitocromo B (phyB) que ejerce su función en la vía de señalización del ABA. Además, evaluamos el rol de auxinas en la promoción de la germinación por luz y demostramos la importancia de los procesos de transporte que involucra a las proteínas PIN. Semillas de muchas especies necesitan temperaturas alternadas antes del estímulo de luz para germinar. Demostramos que la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* embebidas a ciclos cortos de temperaturas alternadas y luego a un pulso de luz R es mediada por phyB y requiere de la presencia de alelos funcionales *PRR7* y *TOC1*. Adicionalmente, los ciclos diarios de temperatura en oscuridad reducen los niveles de DOG1, permitiendo que la expresión de *TOC1* promueva la germinación. Nuestros resultados ponen de relevancia el rol de algunos componentes del reloj circadiano relacionados con la acción de DOG1 en el control de la germinación por luz y temperaturas alternadas.

Palabras Clave: dormición, germinación, luz, temperaturas alternadas, reloj circadiano, auxina, *splicing* alternativo, *ATHB2*, *DOG1*.

ABSTRACT

Light and alternating temperatures are two signals promoting the relief of seed dormancy in many species. The promotion of seed germination also depends on the changes that occur in hormone levels, with GA promoting and ABA inhibiting germination. Even though there are many levels of gene regulation modulated by photoreceptors, there is no information available at the splicing level of the mRNA by light, although there is evidence of its importance in the regulation of several physiological processes. In this work, we analyze transcriptional and post-transcriptional changes of Col-0 seeds irradiated with R or FR light and we demonstrate that alternative splicing is a relevant mechanism that confers an additional level of gene regulation. By using physiological and molecular approaches, we show that *ATHB2* is a negative regulator of phyB-dependent seed germination, exerting its function on the ABA signaling pathway. In addition, we evaluated the role of auxins in the promotion of light germination and demonstrate the importance of the auxin transport involving PIN proteins. Seeds of many species need alternating temperatures before light irradiation to germinate. We show that the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds imbibed under short cycles of alternating temperatures followed by a R pulse is mediated by phytochrome B and requires the presence of functional *PRR7* and *TOC1* alleles. In addition, daily cycles of alternating temperatures in darkness reduce the protein levels of DOG1, allowing the expression of *TOC1* to induce seed germination. Our results highlight the role of some components of the circadian clock related to the action of DOG1 in the control of germination by light and alternating temperatures.

Keywords: seed dormancy, seed germination, light, alternating temperatures, circadian clock, auxin, alternative splicing, *ATHB2*, *DOG1*.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.1. INTRODUCCIÓN.

Durante su ontogenia en la planta madre las semillas de la mayoría de las especies adquieren un elevado nivel de dormición que impide la germinación aún en condiciones que en otras circunstancias fisiológicas serían favorables (Bewley, 1997). La dormición es un efectivo punto de control del desarrollo porque tiene una influencia decisiva en determinar en qué circunstancias de tiempo y espacio ocurre la germinación de la semilla y el desarrollo de la futura plántula.

Las semillas de numerosas especies presentan un cierto nivel de dormición inmediatamente después de haber sido dispersadas por la planta. De esta manera, los individuos de las especies vegetales evitan el posible peligro de que las semillas germinen sobre la propia planta que las ha producido, fenómeno conocido como brotado pre-cosecha, asegurando, además, la dispersión en el tiempo y espacio, la cual se logra con el mantenimiento de la dormición de las semillas, que puede durar desde pocos días hasta varias décadas, dependiendo de las características genéticas de la especie y de los factores ambientales presentes. En cualquier caso, tras la dispersión de la simiente, los factores endógenos y ambientales que inciden sobre la semilla tenderán a reducir gradualmente la dormición (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). La dormición puede ser reducida por factores como la post-maduración (tiempo desde que la semilla está madura hasta que germina), la temperatura, la hipoxia, los tratamientos de frío en semillas embebidas (estratificación), etc. (Benech-Arnold et al., 2000).

La terminación de la dormición depende de la interacción de factores endógenos (morfológicos, hormonales o metabólicos) y factores exógenos o ambientales (luz, temperatura, nitratos, entre otros). Factores como la luz, los nitratos o las temperaturas alternadas terminan la dormición cuando el nivel de dormición es bajo. Por ejemplo, la salida de la dormición por la temperatura en especies arbóreas contribuyen al establecimiento de patrones temporales de germinación en el bosque (Arana et al., 2006). Por otro lado, la ruptura de la dormición por temperaturas alternadas estimula la germinación de aquellas semillas que se encuentran bajo claros de vegetación en el canopeo (Benech-Arnold, 1998) o cerca de la superficie del suelo (Ghersa et al., 1992). La luz termina la dormición y promueve la germinación a través de la acción de los fitocromos en respuesta a la apertura de claros por pastoreo, inundaciones, en el bosque (Insausti et al., 1995; Battla et al., 2000; Giordano et al., 2009) y/o disturbios en el suelo por los implementos de labranza (Scopel et al., 1991; Botto et al., 1998). El aumento de los nitratos en el suelo también puede contribuir a la salida de la dormición e inducción de la germinación de las semillas (Derkx & Karssen, 1993a; Ali-Rachedi et al., 2004; Alboresi et al., 2005).

1.2. EL ESTADO DE DORMICIÓN EN LAS SEMILLAS.

Una de las propiedades adaptativas más importantes de las plantas es la capacidad que presentan las semillas de retener su viabilidad durante largos períodos de tiempo, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas en un estado quiescente (Baskin &

Baskin, 1998). Cuando las condiciones del medio son las adecuadas para el desarrollo de la nueva plántula, se produce la germinación de la semilla; si, en cambio, las condiciones no son favorables para que la germinación se complete con éxito, las semillas no germinan y se mantienen en dicho estado de quiescencia. Sin embargo, algunas semillas no germinan aunque las condiciones sean favorables debido a características intrínsecas de la propia semilla (Bewley, 1997; Baskin & Baskin, 1998). Estas semillas presentan dormición, que se define como la incapacidad para germinar de una semilla viable e intacta bajo condiciones que normalmente favorecen el proceso (Hilhorst, 1995).

La dormición no es un proceso de todo o nada, sino que existe en una amplia gama de intensidades que van desde la dormición absoluta, en la cual la germinación no se produce en ninguna condición ambiental, hasta la ausencia de dormición, que se caracteriza porque las semillas pueden germinar en un rango amplio de condiciones ambientales. En consecuencia, la dormición es un efectivo punto de control del desarrollo ya que tiene una influencia decisiva en determinar en qué circunstancias de tiempo y espacio ocurre el crecimiento y desarrollo de la plántula. Por ejemplo, si la semilla germinara en un ambiente densamente cubierto por la vegetación o a una profundidad inadecuada en el suelo, la plántula encontraría enormes dificultades para capturar los recursos necesarios para crecer y sus posibilidades de éxito serán limitadas. También sería incierto el futuro de una planta sensible a las temperaturas bajas si la germinación se produjera antes de que termine la estación fría. En la medida que la dormición va disminuyendo, aumenta la sensibilidad de las semillas a factores del ambiente como son la luz y las temperaturas alternadas.

La dormición puede ser primaria o secundaria. La dormición primaria se adquiere durante el desarrollo y maduración de la semilla en la planta madre. Se presenta en el momento en que el embrión deja de crecer y está modulada genéticamente, aunque también influyen aspectos metabólicos (estado hormonal de la semilla, flujo de hormonas desde la planta madre) y factores ambientales (factores edáficos, temperatura y luz) (Bewley & Black, 1994). La dormición secundaria se define como la pérdida de la capacidad para germinar de una semilla viable cuya dormición primaria ha sido eliminada previamente. Se desarrolla en semillas maduras una vez dispersadas debido a una disminución en la sensibilidad a los factores que rompen la dormición o que inducen la germinación. Se caracteriza por una incapacidad de germinar debido a un entorno adverso, como puede suceder en ambientes deficientes en oxígeno (Côme & Thevenot, 1982), con temperaturas elevadas (Cone & Spruit, 1983; Hilhorst, 1990a y b; Derkx & Karssen, 1993), o bien como respuesta a diferentes situaciones de estrés (Bewley, 1997).

1.2.1. Significado ecológico de la dormición.

En general, los diferentes mecanismos de dormición tienen como principal finalidad retrasar la germinación y prevenir así que ésta tenga lugar en condiciones ambientales desfavorables para el establecimiento de las plántulas. Que los diferentes mecanismos de dormición de semillas hayan sido mantenidos a través de la evolución hasta nuestros días es, sin duda, una prueba del gran valor adaptativo que éstos suponen

para las especies que los presentan. La dispersión temporal de la especie se logra con el mantenimiento de la dormición de las semillas, que puede durar desde pocos días hasta varias décadas. Tanto el tipo de dormición que presenta una semilla como los factores naturales que eliminan progresivamente esta dormición, están estrechamente ligados con el hábitat en el que se desarrolla la especie.

En numerosas especies de plantas existe un importante *stock* de semillas que permanecen enterradas en el suelo, a diferentes profundidades, constituyendo el denominado banco de semillas del suelo. Con este banco las distintas especies aseguran la existencia de una cierta cantidad de semillas viables enterradas en el suelo que presentan distintos niveles de dormición para que vayan germinando de forma gradual. De esta manera, aumenta considerablemente la probabilidad de supervivencia de las poblaciones vegetales. Las semillas de especies colonizadoras constituyen un porcentaje muy importante de la composición del banco de semillas del suelo. En general, pueden permanecer viables, enterradas en el suelo, durante largos períodos. Como es lógico, la composición del banco de semillas del suelo está estrechamente relacionada con los ciclos biológicos de las especies que se desarrollan en los diferentes hábitats. En la medida en que las semillas presenten dormición, la germinación no ocurrirá al menos en lo inmediato posterior al ingreso al banco de semillas. La ocurrencia de la dormición es una condición necesaria para que una población de semillas pueda formar un banco persistente. La posibilidad de que las semillas entren en dormición secundaria contribuye a la formación de un banco persistente por parte de la población. En efecto, las semillas que pueden ser inducidas a dormición secundaria frecuentemente presentan un patrón de dormición cíclico que les permite no estar “germinables” durante largos períodos a lo largo del año y sólo estarlo cuando las condiciones ambientales favorecen el establecimiento exitoso de la planta a la que darán origen.

1.3. *DOG1 (DELAY OF GERMINATION 1)* COMO REGULADOR DE LA DORMICIÓN DE LAS SEMILLAS.

Utilizando la variación genética natural entre dos accesiones de *Arabidopsis thaliana* contrastantes en su nivel de dormición (Ler y CVI) y mediante aproximaciones de genética cuantitativa de mapeos genéticos en una población de líneas recombinantes y endocriadas, el grupo de Koornneef identificó por primera vez al gen *AtDOG1 (DELAY OF GERMINATION 1)* como un QTL (del inglés *Quantitative Trait Locus*) involucrado en la dormición de las semillas. La posterior caracterización del QTL permitió clonar al gen *DOG1* y observar que se expresa específicamente en semillas y que codifica para una proteína con función aún desconocida. Los niveles de transcritos y proteínas en semillas frescas recién cosechadas concuerdan con los niveles de dormición presentes en las semillas, tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones naturales (Bentsink et al., 2006; Nakabayashi et al., 2012). Más aún, la percepción de bajas temperaturas durante la maduración de las semillas aumenta los niveles de dormición, y esto está asociado con un aumento en los niveles de transcritos de *DOG1* (Chiang et al., 2011; Kendall et al., 2011; Nakabayashi et al., 2012). Durante la post-maduración de las semillas, la proteína *DOG1* se mantiene estable, pero pierde su actividad debido a modificaciones post-traduccionales (*splicing* alternativo).

Se han identificado varios homólogos de *AtDOG1* cuyas funciones están altamente conservadas y que aumentan la dormición de las semillas. Especies como *Lepidium* originarias de ambientes diversos en todos los continentes presentan niveles de dormición variados debido a la presencia de ortólogos del gen *AtDOG1* (Graeber et al., 2010, 2013). También se han identificado genes *DOG1*-like en monocotiledóneas como los cereales (Sugimoto et al., 2010; Ashikawa et al., 2010, 2013). La expresión ectópica de dichos genes *DOG1*-like en semillas salvajes de *Arabidopsis thaliana* retrasa la germinación de las semillas.

En *Arabidopsis*, el gen *DOG1* (At5g45830) es miembro de una familia génica con funciones moleculares aún desconocidas, que presenta *splicing*, se expresa tempranamente durante el desarrollo de la semilla y sus efectos van disminuyendo con la post-maduración (Bentsink et al., 2006). Chiang et al. (2011) demostraron que la plasticidad de expresión del gen *DOG1* depende de efectos maternos asociados con la localización geográfica de maduración de las semillas, siendo las accesiones provenientes del sur las que expresan niveles más altos de *DOG1* y consecuentemente las semillas presentan un mayor nivel de dormición. La ausencia de *DOG1* disminuye el nivel de dormición y la sensibilidad al ácido abscísico (ABA), sugiriendo que es una proteína involucrada en esa vía de señalización (Bentsink et al., 2006). Más aún, su abundancia en semillas frescas recién cosechadas determina el nivel de dormición que presentarán las mismas (Graeber et al., 2014). Así, bajos niveles de dormición están relacionados con la inactivación de la proteína *DOG1*, cuya expresión varía a lo largo del año en semillas de *Arabidopsis* enterradas en el suelo, acompañando variaciones de los ciclos de dormición (Footitt et al., 2013). La expresión de *DOG1* correlaciona negativamente con la temperatura del suelo y los niveles de expresión de genes vinculados a las vías del ABA y las giberelinas (GAs) también cambian en consonancia con dichas variaciones (Footitt et al., 2011).

Por otra parte, nuestro laboratorio demostró que el mutante *dog1* tiene una mayor respuesta a la luz cuando la germinación es inducida con muy bajos niveles de Pfr (forma biológicamente activa del fitocromo), sugiriendo que puede afectar diferencialmente la vía de acción del phyA (Laserna et al., 2008). Estas evidencias experimentales sugieren que *DOG1* podría ser un actor importante en el control de la germinación por luz. Si bien se sabe que *DOG1* es necesario para imponer dormición primaria, nuestro grupo de trabajo demostró que puede también condicionar la entrada en dormición secundaria de las semillas de *Arabidopsis* (Ibarra et al., 2013 – Tesis Doctoral).

1.4. LA FUNCIÓN DE LAS HORMONAS EN LA DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.

La promoción de la germinación de las semillas depende principalmente de factores internos asociados al balance hormonal entre GAs y ABA. Las giberelinas actúan en la salida de la dormición de las semillas y estimulan la germinación (Bewley & Black, 1994). Por el contrario, la síntesis y acumulación de ABA son necesarias tanto para la inducción como para el mantenimiento de la dormición (Wang et al., 1995; Debeaujon et al., 2000; Grappin et al., 2000; Holdsworth, et al., 2008). Otras hormonas también

pueden contribuir secundariamente en la germinación de las semillas. Se han reportado varias hormonas capaces de regular la división y expansión celular que acompaña el crecimiento. Entre ellas, giberelinas, auxinas y brasinoesteroides se consideran hormonas estimulantes del mismo, mientras que el etileno y las citoquininas fueron originariamente caracterizadas como hormonas que lo inhiben (Neff et al., 2006).

1.4.1. Ácido Abscísico.

El ABA es un derivado de los carotenoides y se lo vincula con la inducción de genes que intervienen en respuesta al estrés, cierre estomático y desarrollo de las semillas (Nambara & Marion-Poll, 2005). Por otro lado, el ABA reprime la germinación y estabiliza el estado de dormición de las semillas (Finch-Savage et al., 2006). El primer precursor de ABA es la zeaxantina, a partir de la cual se genera anteraxantina y trans-violaxantina, estos últimos son convertidos a su vez en compuestos de 40 carbonos que una vez cortados forman compuestos de 15 carbonos y 25 carbonos. Se ha establecido que la síntesis de 9-cis-xantosina a partir de 9-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina se encuentra modulada por la acción de 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) formándose el primer precursor citosólico del ABA. La expresión de NCED responde a estrés ambiental y la actividad de esta enzima es quien determina la velocidad de la biosíntesis de ABA.

Con respecto a las reacciones de las vías catabólicas, es posible categorizarlas en dos tipos: de hidroxilación y conjugación. Normalmente el ABA es convertido en un compuesto hormonalmente inactivo e inestable mediante la intervención de ABA 8'-Hidroxilasa. En *Arabidopsis*, esta enzima pertenece a una familia formada por cuatro miembros (AtCYP707A1-4). El 8'-hidroxi ABA isomeriza espontáneamente a ácido faseico (PA) para luego catabolizar a ácido di-hydrofaseico (DPA). La disminución de los niveles de ABA durante la imbibición de las semillas correlaciona con un incremento en PA. Por otro lado, se ha propuesto que la hidroxilación del ABA modularía los niveles de dormición de las semillas (Rodríguez-Gacio et al., 2009).

El ABA impone dormición primaria en la semilla (Koornneef et al., 2002; Gubler et al., 2005), ya que la deficiencia de ABA durante el desarrollo de la semilla está asociado con la ausencia de dormición primaria en semillas maduras, mientras que la sobre-expresión de genes de la biosíntesis de ABA incrementa la dormición de las semillas o retrasa su germinación (Finkelstein et al., 2002; Nambara & Marion-Poll, 2003; Kushiro et al., 2004). Mediante análisis genéticos, de expresión y metabólicos se demostró que miembros de genes de la familia *NECD* (*NECD6* y *NECD9*) son esenciales para la síntesis de ABA tanto en el embrión como en el endosperma de las semillas de *Arabidopsis* (Lefebvre et al., 2006). Además de estos genes relacionados con el mantenimiento de la dormición, también se han identificado genes relacionados con la salida de la dormición a través de la vía del catabolismo del ABA, como *CYP707A2* (Millar et al., 2006; Cadman et al., 2006).

La mayoría de los mutantes de señalización de ABA fueron seleccionados, aislados y caracterizados por sus diferentes comportamientos en la germinación o en el desarrollo de la plántula en presencia de ABA exógeno (Koornneef et al., 1984;

Finkelstein, 1994; Culter et al., 1996). Por ejemplo, los mutantes insensibles a ABA *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5* y *abi8* fueron aislados por su capacidad de germinar en concentraciones de ABA que inhibía la germinación de las semillas salvajes. Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican para proteínas fosfatasa del tipo 2C (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Leung et al., 1997) y diversos estudios indicaron que éstos son reguladores negativos de la señalización del ABA (Sheen, 1996; Leung et al., 1997; Sheen, 1998). Por otro lado, *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* codifican para diferentes tipos de factores de transcripción que regulan el desarrollo del embrión, la maduración de la semilla y su respuesta al ABA (Giraudat et al., 1992; Finkelstein et al., 1998; Finkelstein & Lynch, 2000; Lopez-Molina & Chua, 2000). Estudios genéticos y bioquímicos sugieren que *ABI5* es regulado positivamente por *ABI3*, aparentemente a través de una interacción directa entre estos dos factores (Lopez-Molina et al., 2001). *ABI8* estaría involucrado en la interacción entre ABA y azúcares (Boccard-Gifford et al., 2004).

1.4.2. Giberelinas.

Las giberelinas regulan varios procesos del desarrollo a lo largo del ciclo de vida de una planta, desde la germinación, pasando por la expansión de las hojas, la inducción de la floración, hasta el control del desarrollo de la semilla (Sun & Gubler, 2004). Las rutas biosintéticas de las giberelinas se han dilucidado con la asistencia de herramientas bioquímicas y aproximaciones genéticas. Sólo los pasos iniciales de biosíntesis se encuentran conservados de forma interespecífica, siendo los últimos pasos aquellos en donde se observan diferencias según la especie. La biosíntesis de giberelinas se inicia con la modificación enzimática del precursor geranilgeranil difosfato hasta conseguir GA_4 (forma biológicamente activa) (Hedden & Phillips, 2000). En la mayoría de los casos se requiere de la actividad de enzimas del tipo 20 Oxidasa ($GA_{20}OX$) y 3 Oxidasa (GA_3OX) para mantener los niveles de GA. La enzima 2 Oxidasa (GA_2OX) es la encargada de catabolizar GA. Los niveles endógenos de GA dependen de una autoregulación transcripcional donde altos niveles de GA inhiben la expresión de genes que codifican para $GA_{20}OX$ y GA_3OX y promueven, a su vez, la expresión de GA_2OX (Weiss et al., 2007).

Dentro de las vías de transducción de señales de las giberelinas, se han identificado proteínas DELLAs pertenecientes a la familia GRAS (factores de transcripción específicos de plantas) caracterizadas como reguladores negativos de las vías de acción de las giberelinas. En *Arabidopsis*, esta familia comprende a los genes *GAI* (*GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE*), *RGA* (*REPRESSOR OF GA*), *RGL1* (*RGA-LIKE 1*), *RGL2* (*RGA-LIKE 2*) y *RGL3* (*RGA-LIKE PROTEIN 3*) (Peng et al., 1999; Dill & Sun, 2001; Richards et al., 2001; Lee et al., 2002; Wen & Chang, 2002). Se ha comprobado que los genes *GAI* y *RGA* participan como represores de la elongación del tallo, cuya acción es anulada por las giberelinas (Silverstone et al., 1998; Peng et al., 1999; Richards et al., 2001). En la germinación, se comprobó que dentro de la familia DELLA, el gen *RGL2* es el principal regulador negativo de la germinación, ya que la germinación de mutantes *rgl2* es resistente a la presencia de inhibidores de la biosíntesis de giberelinas en el medio (Lee et al., 2002). Recientemente, estudios bioquímicos comprobaron que las giberelinas promueven la elongación del tallo, el desarrollo floral y la germinación a través de la degradación de las proteínas RGA, GAI y RGL2 por la

vía del proteasoma 26S (Silverstone et al., 2001; Fu et al., 2004), y este efecto requiere de la acción de SLY (SLEEPY 1) (McGinnis et al., 2003; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004).

Durante la post-maduración y la estratificación de las semillas se incrementa la sensibilidad a las GAs (Derkx et al., 1993; Yamauchi et al., 2004). Desde un punto de vista molecular, existen evidencias que muestran que los tratamientos que provocan la salida de la dormición producen un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis de GA activas, como GA3oxidasa o GA20oxidasa, mientras que disminuyen los transcriptos relacionados con su catabolismo, como la GA2oxidasa (Yamauchi et al., 2004; Finch-Savage et al., 2007).

Las giberelinas actúan en la salida de la dormición de las semillas y estimulan la germinación mediante la inducción de enzimas hidrolíticas que actúan en la región micropilar y atenúan las barreras que impiden el crecimiento del embrión (Bewley & Black, 1994). En semillas de *Arabidopsis thaliana*, la formación de Pfr promueve la expresión de los genes *GA3ox1* y *GA3ox2*, los cuales también codifican para dos enzimas GA3 β -hidroxilasas (Yamaguchi et al., 1998; Yamauchi et al., 2004). En semillas de otras especies como pimiento (Watkins et al., 1985), tomate (Groot & Karssen, 1987) y *Datura ferox* (Sánchez & de Miguel, 1997), la acumulación de mensajeros de GA3 β -hidroxilasa está fuertemente promovida por luz roja. En dichas especies las giberelinas juegan un rol central en el ablandamiento del endosperma micropilar, un proceso indispensable para la germinación. Por ejemplo, el endosperma micropilar de las semillas de *D. ferox* es una barrera mecánica que impide el crecimiento del embrión y consecuentemente la germinación de la semilla. La dureza del endosperma micropilar está relacionada con el contenido de polímeros de manosa, un β -(1-4) manano. La imbibición de las semillas en temperaturas alternadas e irradiadas con un pulso de luz roja incrementa la proporción de Pfr y reduce significativamente el contenido de mananos de las paredes del endosperma micropilar (Sánchez et al., 1990). Esta disminución de mananos está vinculada a un aumento en la actividad de dos enzimas que degradan mananos como endo- β -mananasa y β -manosidasa (Sánchez & de Miguel, 1997). La luz roja también estimula la acumulación de transcriptos de endo- β -mananasa (*DfMan*) y de expansinas (*DfExp1*) en el endosperma micropilar (Mella et al., 2004; Sánchez & Mella, 2004).

La promoción de la germinación de las semillas depende principalmente de factores internos asociados al balance hormonal entre GAs y ABA. Sin embargo, otras hormonas también pueden contribuir secundariamente en la germinación, como las auxinas, aunque su rol en la dormición y germinación de semillas no ha sido del todo explorado. Si bien los estudios transcriptómicos en semillas de *Arabidopsis thaliana* que germinan a la luz demuestran que las auxinas y transportadores son necesarios, aún no hay estudios funcionales que conecten la actividad de los transportadores de auxinas en el fotocontrol de la germinación.

1.5. LA TEMPERATURA Y LA SALIDA DE LA DORMICIÓN.

Los factores que regulan el nivel de dormición son los que determinan los patrones estacionales de emergencia en el campo. Estos factores modifican el nivel de dormición de los bancos de semillas produciendo cambios estacionales en el comportamiento germinativo de las mismas, a través de la alteración de la sensibilidad de las semillas a las señales ambientales (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Las semillas son capaces de percibir las señales ambientales vinculadas a cambios estacionales lentos (principalmente la temperatura; Probert, 2000) lo que les permite determinar el tiempo del año y la profundidad del suelo a la que se encuentran (Finch-Savage & Footitt, 2017). Las respuestas a la temperatura difieren entre las especies, lo que conlleva a que cada especie presente tiempos de germinación característicos (Battla & Benech-Arnold, 2015). Estos tipos de respuestas modifican los niveles de dormición y la sensibilidad de las semillas a señales relacionadas a su entorno físico, entre ellas, luz, nitratos y potencial osmótico. Estas señales le indican a las semillas cuándo las condiciones para la ocurrencia de la germinación son las correctas, y de esta forma se induce la ruptura de la dormición (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

La temperatura del suelo ha sido señalada como el principal factor modulador de los niveles de dormición en semillas de muchas especies (Baskin & Baskin, 1985; Battla & Benech-Arnold, 2010). En el caso de especies anuales de emergencia primavero-estival, se considera que las bajas temperaturas invernales actúan como aliviadoras de la dormición determinando un mínimo de dormición hacia la entrada de la primavera, mientras que las altas temperaturas que se registran a finales de la primavera y principios del verano, inducirían aumentos en los niveles de dormición determinando la entrada en dormición secundaria. Este tipo de comportamiento ha sido observado en varias especies maleza de emergencia primavero-estival (Baskin & Baskin, 1980; Bouwmeester, 1990; Kruk & Benech-Arnold, 1998). Por el contrario, en especies otoño-invernales, las temperaturas altas del verano actuarían como aliviadoras de la dormición, mientras que las bajas temperaturas invernales inducirían la entrada en dormición secundaria de la población de semillas (Karssen, 1982). Mientras que el proceso de disminución del nivel de dormición por bajas temperaturas en especies primavero-estivales generalmente requiere que las semillas se encuentran parcialmente embebidas, el proceso de disminución del nivel de dormición por altas temperaturas en especies otoño-invernales requiere que las semillas tengan un bajo nivel de humedad (conocido como post-maduración en seco). Así, el nivel de humedad de las semillas actúa como un factor modulador del efecto de la temperatura sobre el nivel de dormición.

1.6. LA LUZ Y LA SALIDA DE LA DORMICIÓN.

La salida de la dormición en semillas de muchas especies puede ser causada por la luz (Bewley & Black, 1982). Dependiendo de la genética de cada especie, la germinación puede ser promovida, inhibida o independiente de la luz (Bewley & Black, 1982; Frankland & Taylorson, 1983; Casal & Sánchez, 1998).

Existen diferentes grupos de fotorreceptores capaces de percibir las señales lumínicas (Fig.1.6.):

(1) Fitocromos (PHY): absorben luz correspondiente a las longitudes de onda del rojo (590 -710 nm) y del rojo lejano (710-750nm).

(2) Criptocromos (CRY) y Fototropinas (PHOT): absorben la luz correspondiente a las longitudes de onda del azul y UV-A (400-495 nm).

(3) UVR-8: absorbe la luz correspondiente a la longitud de onda del UV-B (menos de 400 nm).

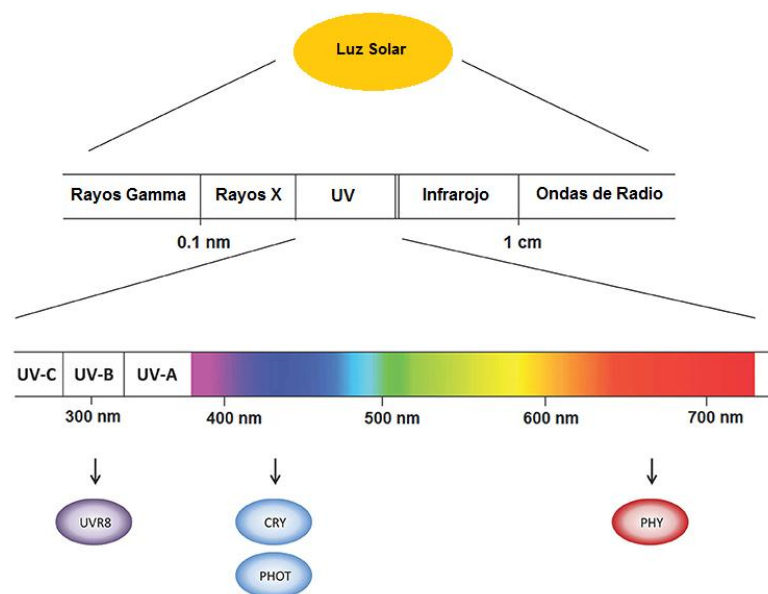


Fig.1.6. Espectro de luz solar y principales fotorreceptores en plantas. CRY: criptocromos; PHY: fitocromos; PHOT: fototropinas; UV: ultravioleta; UVR8: fotorreceptor de UV-B. Modificado de Zoratti et al., 2014.

1.6.1. Características fotobiológicas, genéticas y moleculares de los fitocromos.

En *Arabidopsis thaliana*, la terminación de la dormición por luz es mediada por los fitocromos. Estos fotorreceptores son proteínas fotorreversibles que tienen la capacidad de interconvertirse en dos isómeros estables: la forma que absorbe eficientemente luz roja (R, Pr = $\lambda_{\text{máx}}$ 660 nm) y la que absorbe eficientemente luz roja lejana (RL, Pfr = $\lambda_{\text{máx}}$ 730 nm) (Quail et al., 1995; Fankhauser & Chory, 1997) (Fig.1.6.1.1.). Sin embargo, es importante notar que existe un solapamiento entre los espectros de absorción de ambas formas (Fig.1.6.1.1.). Esto implica que cuando un tejido vegetal es expuesto a la luz, la fotoconversión entre las formas Pr y Pfr ocurre en ambos sentidos, estableciéndose así una determinada relación de Pfr/fitocromo total (Pfr/P). Por

ejemplo, un pulso saturante de luz R establece una relación máxima Pfr/P de 0.87, mientras que la exposición de los tejidos a luz saturante de RL=730 nm no será capaz de transformar todo el fitocromo activo a la forma Pr, sino que establecerá una relación mínima de Pfr/P de 0.03 (Casal et al., 1998).

Los fitocromos son sintetizados en su forma Pr, mediante una reacción autocatalítica que se produce al unirse, en el citoplasma, la apoproteína y el grupo cromóforo (Lagarias & Lagarias, 1989). La forma Pr posee localización citoplásmica, y cuando absorbe luz y se convierte a la forma Pfr se transloca al núcleo (Nagy et al., 2001). El Pfr también puede destruirse (Marme et al., 1971) o convertirse en Pr mediante una reacción independiente de la luz (reversión) (Kendrick et al., 1971), conocida como reversión en oscuridad.

La molécula del fitocromo puede ser dividida en dos regiones funcionales principales: (1) la región amino-terminal, que es el sensor de la señal y posee un cromóforo unido covalentemente; y (2) la región carboxi-terminal o de transducción de la señal, que contiene dos dominios relacionados a los Per/Arnt/Sim (PAS) y un dominio relacionado a los de histidina kinasa de bacterias. El dominio N-terminal es responsable de la unión al cromóforo, de la absorción de la luz y de la fotorreversibilidad (~70 kDa). El dominio C-terminal (~55 kDa) contiene varios subdominios/motivos conservados, incluyendo la secuencia reguladora core (Quail box), dos motivos de dimerización y el dominio HKRD (Histidine Kinase-Related Domain) (Fig.1.6.1.1.).

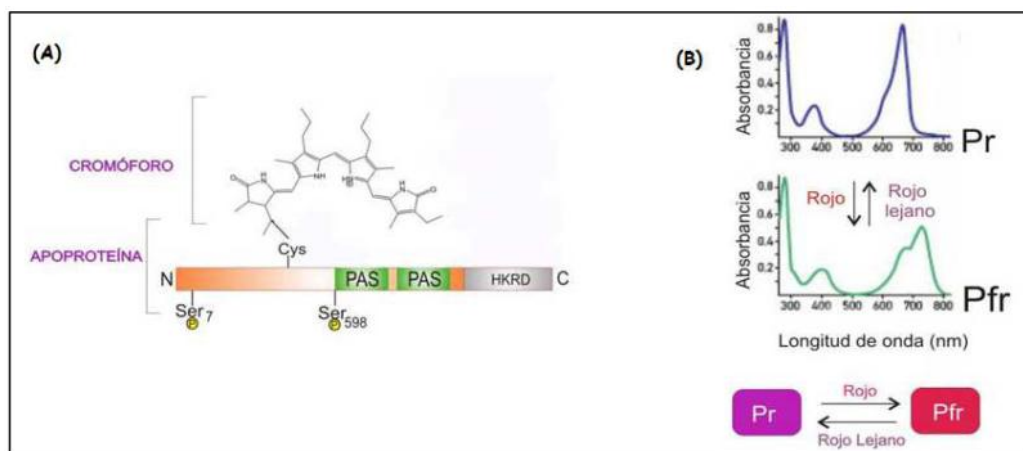


Fig.1.6.1.1. Características de los fitocromos. (A) Esquema de la estructura del fitocromo. Los fitocromos absorben la luz con el cromóforo (un tetrapirrol lineal abierto) que está unido covalentemente en la cisteína 320 (PHYA) o 322 (PHYB) del dominio amino-terminal de la apoproteína. En las posiciones 7 y 538 se muestran las serinas que intervienen en los cambios conformacionales y en la señalización por fosforilación. El dominio carboxilo-terminal de la apoproteína contiene dos repeticiones PAS, que inician la cascada de señalización a través de la interacción con el factor PIF3 y presenta un dominio histidina-kinasa (HKRD) involucrado en la fosforilación de la proteína sustrato-kinasa del fitocromo 1 (SK1). SK1 regula negativamente la señalización del fitocromo. Tomado y modificado de Yanovsky et al., 2002. (B) Espectro de absorción de los fitocromos y cambio de conformación que sufren de acuerdo a la calidad de la luz que reciben. Adaptado de Schäfer y Bowler, 2002.

Dependiendo de la especie, existen variados números de genes que codifican para los fitocromos. En *Arabidopsis thaliana* se conocen 5 genes distintos, los cuales fueron llamados fitocromos A, B, C, D y E (PHYA-E) (Casal, 2002). Son proteínas solubles de aproximadamente 125 KDa. Su estructura es homodimérica en la que cada subunidad está unida covalentemente a un cromóforo constituido por un tetrapirrol lineal abierto denominado fitocromobilina (Fig.1.6.1.1.). La excitación del cromóforo modifica la configuración de la proteína, alterando su capacidad de acción biológica.

En gramíneas sólo están presentes los PHYA, PHYB y PHYC (Mathews et al., 1995; Mathews & Sharrock, 1996; Childs et al., 1997; Basu et al., 2000). En maíz, una duplicación del genoma (Gaut & Doebley, 1997) trajo como consecuencia un aumento en el número de componentes de la familia PHY, aumentando así el número a 6 miembros llamados PHYA1, PHYA2, PHYB1, PHYB2, PHYC1 y PHYC2 (Sheehan et al., 2004). En otras especies como tomate, existen 5 genes *PHY*. Cuatro de ellos (*PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2* y *PHYE*) codifican para apoproteínas que comparten cerca del 88%-98% de similitud de la secuencia aminoacídica de un dominio conservado con *Arabidopsis* (Hauser et al., 1995). El quinto gen *PHY*, llamado *PHYF*, codifica para una apoproteína que comparte sólo un 74% de similitud en la secuencia aminoacídica con el PHYC de *Arabidopsis* (Hauser et al., 1995; Pratt et al., 1997).

1.6.2. Síntesis de los fitocromos en las semillas.

Los fitocromos pueden ser sintetizados en las semillas durante dos momentos distintos. Uno de ellos es durante su formación en la planta madre, como fue observado en *Amaranthus* (Kendrick et al., 1969; Kendrick & Spruit, 1977), y en la semilla madura seca pueden encontrarse tanto en la forma Pr como Pfr, dependiendo de las propiedades ópticas de las cubiertas seminales y del fruto, o si el fruto fue sombreado por hojas verdes. Esto significa que el requerimiento de luz para la germinación dependerá del ambiente materno donde se formaron las semillas. En el caso que se establezca una alta proporción de Pfr/P durante la maduración, el Pfr formado durante el desarrollo de la semilla podría estimular la germinación de ésta una vez en el suelo, aún en completa oscuridad. En *Arabidopsis thaliana*, el PHYB comprende, al menos en parte, el *pool* de los fitocromos formados durante el desarrollo de la semilla (Shinomura et al., 1996). El segundo momento de síntesis de fitocromos en la semilla puede ocurrir luego de la imbibición, como fue observado en semillas de *Amaranthus caudatus* (Kendrick et al., 1969). Los estudios inmunológicos indican que la abundancia de PHYA aumenta significativamente unas horas después del comienzo de la imbibición en oscuridad en semillas de *Arabidopsis* (Shinomura et al., 1996). Se ha demostrado además que el PHYB y el PHYC también son sintetizados durante la imbibición en oscuridad, aunque en cantidades relativamente menores al PHYA (Sharrock & Clack, 2002).

1.6.3. Modo de acción de los fitocromos.

Los distintos fitocromos pueden tener funciones discretas o solapadas en las semillas. Las respuestas a la luz de las semillas son mediadas por fitocromos distintos. La acción de los fitocromos puede ser distinguida sobre la base de la cantidad, calidad y duración del tratamiento lumínico necesario para inducir la respuesta. La cantidad de luz puede ser referida como flujo de luz, el cual es definido como el número de fotones incidentes por unidad de superficie, usualmente cuantificado como micromoles de fotones por metro cuadrado ($\mu\text{mol.m}^{-2}$). Se han descrito tres modos de acción de los fitocromos: (1) la respuesta a muy bajos flujos de luz, llamada VLFR (del inglés *Very Low Fluence Response*), (2) la respuesta a bajos flujos, o LFR (del inglés *Low Fluence Response*) y (3) la respuesta a altos flujos de luz o HIR (del inglés *High Irradiance Response*) (Casal et al., 1998).

(1) VLFR: cuando las semillas poseen una alta sensibilidad a la luz, la germinación puede ser inducida por muy pocos fotones de luz solar y saturarse con un RLp, a través de una VLFR mediada exclusivamente por el phyA (Botto et al., 1996). Como un RLp convierte aproximadamente el 97% del Pfr a Pr, sólo el 3% Pfr remanente satura este tipo de respuesta que no puede ser revertida por el RL (Taiz & Zeiger, 1998) (Fig.1.6.3.1.). La magnitud de esta respuesta es evaluada en el laboratorio como la diferencia en el porcentaje de semillas germinadas con un RLp y oscuridad.

(2) LFR: si se establecen niveles más altos de Pfr en las semillas, por ejemplo con un Rp, la germinación es promovida por una LFR a través de la acción del phyB y otros fitocromos estables (Fig.1.6.3.1., Botto et al., 1995; Hennig et al., 2002; Arana et al 2014). Las proporciones de Pfr que inducen una LFR son establecidas por pulsos moderados de luz R, siendo esta respuesta revertida con un RLp (Mancinelli, 1994). Esta es una respuesta R/RL reversible por lo que la magnitud de la reversión de respuesta del efecto del R disminuye a medida que aumenta el intervalo de tiempo entre el pulso de luz R y RL (Casal et al., 1998).

(3) HIR: en ciertas especies, la luz RL continua puede inhibir la germinación de las semillas a través una fotorespuesta del tipo HIR (Shichijo et al., 2001; Auge et al., 2009). Las respuestas de tipo HIR requieren de exposiciones prolongadas a la luz RL (Taiz & Zeiger, 1998). Estas respuestas no cumplen la ley de reciprocidad entre tiempo y cantidad de fotones y consecuentemente exposiciones continuas a la luz RL son más eficientes para inducir la respuesta HIR en comparación con los RLp, que suministran igual flujo total. El fotorreceptor que media las respuestas HIR es el PHYA (Shichijo et al., 2001; Casal et al., 2003).

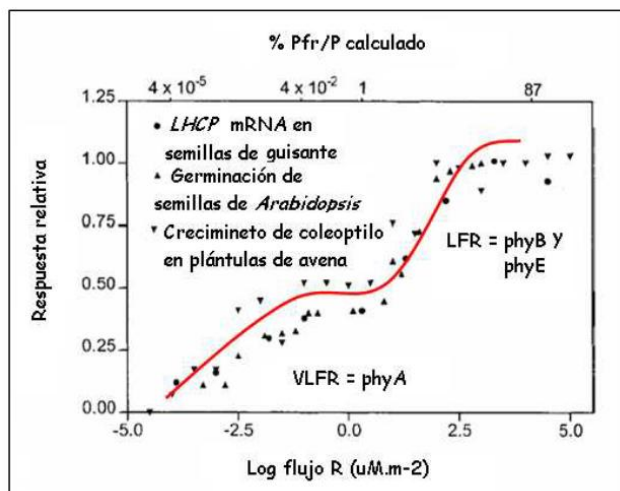


Fig.1.6.3.1. Modos de acción de los fitocromos. Representación esquemática de los modos de acción de los fitocromos en función del fotoequilibrio calculado (Pfr/P). VLFR: respuestas a muy bajos flujos de luz, LFR: respuestas a bajos flujos de luz. Adaptado de Casal et al., 1998.

1.6.4. Importancia ecológica de las respuestas a la luz en las semillas.

Durante la permanencia en el suelo, las semillas sufren alteraciones en su estado de dormición asociadas a cambios en la sensibilidad a determinados factores ambientales. Algunos de esos factores han sido propuestos como señales que perciben las semillas para inducir la germinación. Las evidencias experimentales de campo indican que las semillas de ciertas especies son capaces de responder a cambios en el ambiente lumínico percibidos por los fitocromos, a través de la acción de los diferentes modos de respuesta (VLFR, LFR y HIR). Por ejemplo, las semillas de las malezas manifiestan cambios de sensibilidad a la luz durante la permanencia en el suelo (Taylorson, 1972; Froud-Williams et al., 1984; Bouwmeester & Karssen, 1989; Botto et al., 1998). Scopel et al. (1991) demostraron que la sensibilidad de las semillas de *Datura ferox* a la luz se incrementa cuatro órdenes de magnitud cuando permanecen enterradas en el suelo durante dos meses, comparadas a aquellas almacenadas en seco. La exposición de las semillas a la luz durante las labores agrícolas previas a la implantación de un cultivo es suficiente para promover la germinación, siendo este mecanismo de percepción del disturbio esencial para promover la germinación de las semillas que necesitan luz. La inducción de la germinación en respuesta a exposiciones cortas de luz (VLFR) durante las labranzas favorecen la aparición de plántulas de malezas cuando el suelo está descubierto (Scopel et al., 1991). En condiciones de campo, estas respuestas de muy alta sensibilidad a la luz son adquiridas por semillas de malezas enterradas en los bancos agrícolas. Durante el desarrollo de los cultivos, los suelos quedan descubiertos o cubiertos con broza entre cultivo y cultivo. Previo a la implantación de un nuevo cultivo, es común desarrollar labranzas para preparar la cama de siembra. Se ha

demostrado en ensayos a campo bajo condiciones controladas de luz, que una proporción significativa de las semillas de malezas de los bancos agrícolas es capaz de germinar a través de una VLFR inducida por la exposición de las mismas a milisegundos de luz solar al remover la gleba del suelo con los implementos de labranza (Scopel et al., 1991, Scopel et al., 1994; Botto et al., 1998). La magnitud de esta respuesta depende de las condiciones previas de entierro (profundidad, cobertura del suelo, historia agrícola del potrero, tiempo de entierro, etc.) y de la disponibilidad de agua en el suelo luego de las labranzas (Botto et al., 1998a; Botto et al., 1998b; Botto et al., 2000).

Las semillas de malezas que permanecen en la superficie del suelo cuando caen de la planta madre, muchas veces no pueden germinar si están cubiertas por un canopeo, a pesar que las temperaturas sean favorables. Esto sucede porque la luz natural es filtrada por la clorofila de las hojas, que absorbe diferencialmente en el R, modificando la intensidad y la composición espectral de la luz que llega al suelo. Dependiendo de la densidad del canopeo y las características ópticas de los tegumentos, distintos fotoequilibrios pueden establecerse en las semillas. En ciertas especies, la inhibición de la germinación por relaciones bajas de luz R:RL asegura el establecimiento de nuevas plantas, sólo en ausencia de competencia con otros individuos cuando se generan “gaps” de suelo descubierto. En las pasturas, las semillas de *Lolium multiflorum* germinan en los espacios raleados por el pastoreo del ganado vacuno, en respuesta a cambios en la composición espectral de la luz. Deregibus et al. (1994) demostraron que la germinación de las semillas de esa especie está mediada por una LFR. Por otra parte, Vázquez-Yañes & Orozco-Segovia (1990) encontraron que las semillas de algunas especies de los ambientes boscosos tropicales, como *Cecropia obtusifolia* y *Piper umbellatum*, germinan cuando se incrementa la relación R:RL como consecuencia de la destrucción del canopeo.

En los ambientes agrícolas, las semillas pueden encontrarse expuestas a la luz cuando permanecen sobre suelos desnudos o cubiertas por el rastrojo. En esas condiciones, la inhibición de la germinación puede resultar favorable para la supervivencia de la especie, debido a los efectos negativos de la desecación o a la desequilibrada competencia con los individuos más grandes. Se ha sugerido que las HIRs operan inhibiendo la germinación de las semillas en alguna de esas circunstancias (Gorski et al., 1978). En semillas de tomate, que no tienen dormición, la germinación también está modulada por los fitocromos (Macinelli et al., 1966; Shichijo et al., 2001). Éstas pueden germinar en oscuridad debido a la presencia de Pfr formado durante la maduración que se encuentra presente en la semilla seca (Mancinelli et al., 1967; Bewley et al., 1997). La remoción de la forma activa de los fitocromos mediante un RLp puede inhibir la germinación si es aplicado al poco tiempo del comienzo de la imbibición. Sin embargo, luego de 20 horas o más del comienzo de la imbibición, un sólo RLp no es suficiente para revertir la promoción. Por el contrario, una exposición prolongada a RL tiene efecto inhibitorio a través de una HIR independientemente del momento en que comienza (Shichijo et al., 2001). Semillas de tomate sin phyA funcional (mutantes *fril-1*, far-red insensitive 1-1) son menos inhibidas por el RL continuo (RLc), indicando la importancia de este fitocromo en este proceso (Shichijo et al., 2001). Considerando que la acción inhibitoria del RLc a través del phyA no ha sido encontrado en semillas de *Arabidopsis thaliana*, las semillas de tomate resultan un muy buen sistema para estudiar un proceso que influye en la germinación de muchas especies y que es de considerable importancia biológica (Casal & Sanchez, 1998). La

vía de señalización iniciada por el phyA en respuesta al RLc no regula la expresión de todas las actividades necesarias para la germinación que están controladas por el Pfr de los fitocromos estables, y sólo un pequeño número de genes participan en la inhibición de la germinación. Esto puede favorecer la rápida reactivación de la germinación cuando los cambios en el ambiente lumínico establecen una relación Pfr/P suficientemente alta que llega a las semillas y suprime el efecto inhibitorio del RLc (Auge et al., 2009). Los diferentes componentes del sistema de degradación de la pared celular están controlados independientemente por los diferentes fitocromos al nivel de expresión génica y sugieren que la germinación puede ser modulada por la interacción de una variedad de factores ambientales hasta el último momento antes de la emergencia de la radícula. Mediante análisis de microarreglos en semillas de tomate salvajes (Money Maker) y mutantes *fri1-1*, Auge et al (2009) demostraron que un grupo de genes que forman parte de redes de señalización relacionadas con la acción de la luz y las hormonas en otros procesos fisiológicos, están influenciados por los tratamientos lumínicos que controlan la germinación. De estos genes, se demostró que *GIGANTEA* y *ELIP* están involucrados en la respuesta de tipo HIR mediada por el phyA, mientras que *CSN6*, *RBP* y *SOS2* estarían involucrados en la promoción de la germinación mediada por el Pfr de los fitocromos estables.

Semillas de muchos cultivares modernos de *Triticum aestivum* (trigo) y *Hordeum vulgare* (cebada) presentan bajos niveles de dormición cuando el grano está maduro debido a una selección positiva ejercida durante la domesticación, cuyo objetivo es lograr una germinación rápida y uniforme de los granos (Gubler et al., 2005; Meyer & Purugganan, 2013). Sin embargo, existen diferentes estudios que demuestran que la luz blanca puede inhibir la germinación de semillas en numerosas especies, incluyendo cereales y gramíneas (Ellis et al., 1986; Corbineau et al., 1992; Goggin et al., 2008). Por ejemplo, en cebada, la inhibición de la germinación por luz blanca se debe a los fotones de luz azul; mientras que la luz R y RL no tienen efecto sobre la germinación (Chaussat & Zoppolo, 1983; Gubler et al., 2008). En *Hordeum vulgare* esta inhibición está mediada por CRY1 (CRYPTOCHROME 1) y coincide con un aumento en la expresión de un gen de biosíntesis de ácido abscísico (ABA), principal hormona involucrada en la imposición de la dormición (Barrero et al., 2014), como así también con un aumento en los niveles de ABA en respuesta a exposición a la luz azul (Gubler et al., 2008).

1.7. MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS A LA INDUCCIÓN DE LA GERMINACIÓN POR LUZ.

En semillas de *Arabidopsis* embebidas oscuridad, PIF1/PIL5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5) reprime la germinación mediante la disminución de la respuesta a GAs y la regulación de los niveles de GA y ABA. Como paso inicial, PIF1/PIL5 activa directamente la transcripción de dos DELLAS: GAI y RGA, reguladores negativos de la vía de señalización de GA. Así, se reprimen los genes de biosíntesis de GA y catabolismo de ABA y activan los genes catabólicos de GA y de biosíntesis de ABA, lo que resulta en bajos niveles de GA y altos niveles de ABA. Esta disminución en los niveles de GA activas ayuda a estabilizar a las proteínas GAI y RGA. Por otra parte, el aumento en los niveles de ABA aumenta los niveles de *ABI3* y

ABI5, dos genes de la vía de señalización del ABA, activando en consecuencia las respuestas mediadas por el ABA (Fig.1.7.1.).

A la luz, las formas Pfr de PHYA y de PHYB entran en el núcleo, se unen a PIF1/PIL5 y activan su degradación por el proteasoma 26S (Huq et al., 2004; Oh et al., 2004, 2006). Los bajos niveles de PIF1/PIL5 reducen los niveles de GAI y RGA y aumentan los niveles de GA y disminuye los de ABA. Así, las GA bioactivas promueven la germinación activando la degradación de GAI y RGA (Fig.1.7.1.). Más aún, PIF1/PIL5 regula directamente varios genes de señalización hormonal tales como aquellos involucrados en las vías del ABA (*ABI3* y *ABI5*), auxinas (*IAA16* y *ARF18*), brasinoesteroides (*BIM2*), citoquininas (*CRF1*, *CRF2*, y *CRF3*), GA (*GAI*, *RGA*, y *GID1A*) y ácido jasmónico (*JAZ1*). Varios genes del metabolismo hormonal también son regulados indirectamente por PIF1/PIL5, quien además inhibe la expresión de genes que codifican para enzimas de pared celular, de forma directa (*EXP8*, *EXP10* y *XTH28*) o indirecta (4 genes *EXP* y 6 genes *XTH*) (Oh et al., 2009).

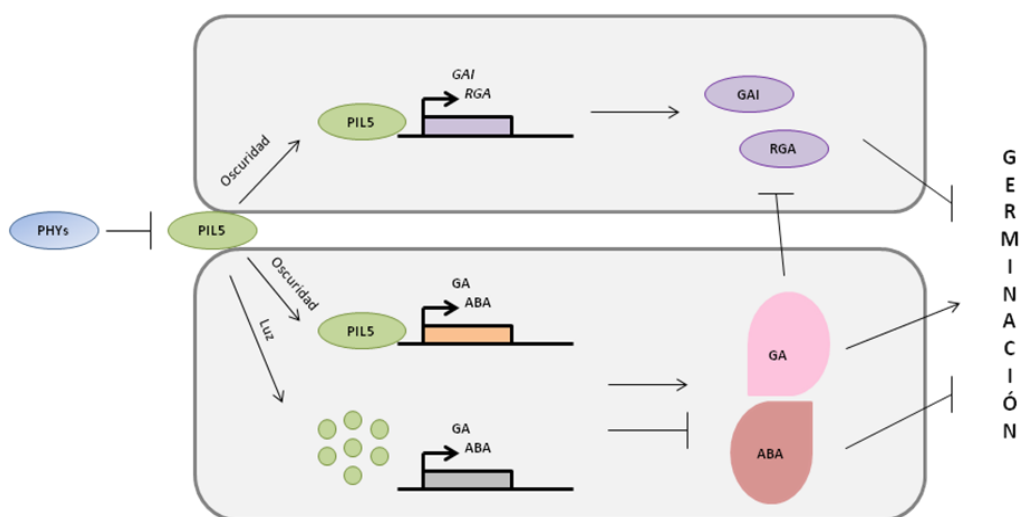


Fig.1.7.1. Modelo molecular de los eventos que conducen a la germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana*. En oscuridad, PIF1/PIL5 activa la expresión de varios genes, entre ellos *GAI* y *RGA*, uniéndose directamente a sus promotores por medio de los G-box. Esto resulta en niveles elevados de sus proteínas. La disminución de los niveles de GA estabiliza a las DELLAs, lo que suprime las respuestas de las GAs. A la luz, los fitocromos inducen la degradación de PIF1/PIL5, resultando en niveles proteicos reducidos de *GAI*, *RGA* y ABA. Como resultado se inician varios procesos fisiológicos, entre ellos, la movilización de moléculas de almacenamiento y la hidrólisis de la pared celular, por lo que las semillas eventualmente germinarán.

Ibarra et al. (2013) han demostrado que la germinación promovida por el phyA a través de una respuesta del tipo VLFR ocasiona cambios en los niveles de expresión del 11% del genoma total de *Arabidopsis thaliana*. El 90% de los genes que modifican su expresión en respuesta a un RLp lo hacen de forma tardía (5 horas posteriores al pulso) e incrementado sus niveles, mientras que el resto modula negativamente su expresión tempranamente (0.5 horas posteriores al pulso). Del mismo modo que para el caso en

que la respuesta a la luz es accionada por phyB, la lista de genes dependientes de phyA incluye varios que codifican para proteínas propias a las vías de señalización de hormonas durante la germinación de las semillas. El análisis del transcriptoma asociado a la acción de phyA sugiere que semillas irradiadas con luz RL incrementan los niveles de phyA-Pfr en el núcleo interaccionando con factores del tipo PIL/PIF (Leivar & Quail., 2010). Esta interacción promovería la expresión de genes asociados a la señalización hormonal, junto con la regulación indirecta sobre genes metabólicos, permitiendo la promoción de la germinación en forma armónica.

Más aún, comparando los transcriptomas phyA-dependiente (Ibarra et al., 2013) y PIF1/PIL5-dependiente (Oh et al., 2009), Ibarra et al. (2013) observaron que algunos genes controlados por phyA se ven también influenciados por PIF1/PIL5. Sin embargo, el 55% de los genes regulados por phyA no son modulados por PIF1/PIL5. Se ha demostrado también que a nivel transcripcional los mecanismos de la salida de dormición primaria que involucran a las vías de acción del phyB en respuesta al R, son parcialmente distintos a los que ocurren cuando la germinación es promovida por el phyA. Esto implica que, si bien la germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana* puede inducirse por acción del phyA o phyB, los mecanismos que desencadenan ambos fitocromos son, al menos en parte, específicos a cada uno de ellos. En el marco de estos hallazgos es posible pensar que de este modo, las semillas germinan en respuesta a un determinado ambiente lumínico por vías específicas que articularán con mecanismos y procesos necesarios para que las plántulas emergentes resulten aptas para el ambiente al que se encontrarán expuestas.

1.8. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A NIVEL DE *SPLICING* DEL ARN MENSAJERO.

Cuando las semillas son expuestas a la luz, la forma activa de los fitocromos se transloca al núcleo e interacciona con PIF1/PIL5, iniciándose cambios irreversibles de la transcripción génica en los tejidos de las semillas que promueven la germinación (Oh et al., 2004; Ibarra et al., 2013). Si bien la iniciación de la transcripción es una de las etapas regulatorias más estudiadas en la expresión de los genes (Leff et al., 1986; Core et al., 2012), el procesamiento de los transcritos y su estabilidad son también mecanismos capaces de modular la cantidad y, más aún, la calidad de producto(s) de un gen. Si bien tenemos un conocimiento bastante completo del transcriptoma promovido por luz en las semillas (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013, entre otros), aún se desconoce la importancia del *splicing* alternativo (SA) en la promoción de la germinación por luz. En este sentido, el SA produce múltiples ARN mensajeros (isoformas) a partir de un solo gen a través de la elección variable y regulada de diferentes sitios de *splicing* (Kornblihtt et al., 2013; Shang et al., 2017). Además de generar diferentes isoformas que pueden ser traducidas en diferentes proteínas, este proceso puede dar lugar también a variantes no codificantes, modulando así los niveles de proteína que se generará (Kalyna et al., 2012; Brown et al., 2015; Cyrek et al., 2016). Por estas razones, el *splicing* alternativo es capaz de regular de manera significativa y precisa la expresión de los genes respecto de los estadios del desarrollo, en diferentes

tejidos y en respuesta a diversas señales ambientales (James et al., 2012; Staiger et al., 2013).

Durante los últimos años algunos trabajos han documentado un aumento progresivo en el porcentaje de genes que sufren SA y su importancia en diferentes procesos tales como la fotosíntesis, respuestas a estrés, regulación del reloj circadiano, señalización hormonal, floración y metabolismo (revisado en Reddy, 2007). Sin embargo, hay muy poca información sobre la relevancia del SA en las semillas y en particular es nulo el conocimiento de cómo la luz puede afectar el SA en la germinación.

1.8.1. El dogma central de la biología.

La información genética presente en la molécula replicable es el ADN, el cual se hereda de generación en generación. Durante el ciclo de vida de una célula, esta información contenida en el ADN da lugar a una molécula de ARN que tiene la misma información, mediante un proceso denominado transcripción. Mientras que el ADN es una molécula químicamente estable, el ARN es más reactivo y por tanto inestable. Es así que el ARN no almacena la información genética, sino que, por medio de la traducción, actúa como intermediario entre el ADN y la síntesis de proteínas.

La transcripción es llevada a cabo por enzimas con actividad ARN polimerasa (pol). Todos los eucariotas poseen tres ARN pol nucleares dependientes de ADN (Archambault & Friesen, 1993). La ARN pol I transcribe el ARN ribosomal (ARNr), la ARN pol II transcribe la mayoría de los genes (incluyendo los que codifican proteínas) y la ARN pol III transcribe ARN de transferencia y ARNr (5S). En el 2005 se descubrió que las plantas tienen una cuarta polimerasa nuclear (ARN pol IV) que es necesaria para la síntesis de un ARN pequeño de interferencia (de 24 bases) y la formación de heterocromatina (Onodera et al., 2005).

1.8.2. Procesamiento del precursor de ARNm.

El procesamiento de los precursores del ARN mensajero (pre-ARNm) fue descubierto en el año 1970, cuando se demostró que los genes de organismos eucariotas contenían secuencias que no estaban presentes en el ARNm maduro: los intrones (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977). Estudios posteriores demostraron que los intrones son removidos mediante un complejo macromolecular denominado *spliceosoma*. El *spliceosoma* es una estructura dinámica y se han identificado más de 300 proteínas en complejos activos de *splicing* (Rappsilber et al., 2002; Jurica & Moore, 2003; Bessonov et al., 2008).

A medida que los pre-ARNm son generados por medio del proceso de transcripción, los mismos van siendo procesados dando lugar a los ARNm maduros. La maduración del mensajero requiere una serie de pasos de procesamiento del pre-ARN: el agregado de un nucleótido GTP modificado en el extremo 5', un corte hacia el extremo 3' del transcripto y la adición de varios nucleótidos de adenina, generando un

extremo 3' definido (corte y poliadenilación), un acortamiento por reacciones de corte y empalme de segmentos internos (*splicing*) y, en algunos casos, la modificación de ciertos nucleótidos. En segundo lugar, mientras que la transcripción y el procesamiento tienen lugar en el núcleo, la traducción ocurre en el citoplasma, por lo que se hace necesaria una maquinaria de exportación de mensajeros.

Uno de los eventos de procesamiento del pre-ARNm más importantes es el *splicing*. Este es un proceso nuclear que se lleva a cabo en todos los eucariotas, por medio del cual se eliminan los intrones y se unen covalentemente los exones (Collins et al., 2005). Este proceso involucra el reconocimiento de las juntas exón-intrón y una reacción de transesterificación de dos pasos para remover el intrón. Todo esto es posible gracias al *spliceosoma*, un complejo dinámico de proteínas y ARN. El *spliceosoma* consiste de (a) 5 proteínas del tipo snRNPs (del inglés *Small Nuclear RiboNucleoprotein Particles*): U1, U2, U4, U5 y U6 y (b) un gran número de componentes proteicos (Kramer et al., 1996; Will et al., 2001). El ensamble del *spliceosoma* se inicia mediante el reconocimiento de los sitios de *splicing* 5' y 3' por parte de la snRNP U1 y del factor auxiliar U2AF (del inglés *U2 snRNP Auxiliary Factor*), respectivamente, formando el complejo E. Luego el factor U2 es reclutado y se une mediante apareamiento específico de bases al BPS (del inglés *Branch Point Sequence*) en una reacción dependiente de ATP, mientras que en simultáneo la proteína SF1/BBP es eliminada, dando como resultado el denominado complejo A del *spliceosoma*, también llamado pre-*spliceosoma*. Posteriormente, los snRNPs U4/U6 y U5 son reclutados como un complejo pre-ensamblado U4/U6-U5 formando el denominado complejo B. Si bien en este complejo se encuentran todos los snRNPs centrales del *spliceosoma*, la primera reacción de transesterificación no se lleva a cabo hasta que no se active el complejo. Esto ocurre tras un cambio conformacional que tiene lugar luego de la liberación de los complejos U1 y U4. De esta manera, el *spliceosoma* es catalíticamente activo (denominado ahora complejo C) y la primera reacción de transesterificación es llevada a cabo. Seguido de algunos cambios conformacionales en algunas RNPs, se produce la segunda reacción de transesterificación y, finalmente, el *spliceosoma* se disocia eliminando el intrón y reciclando los complejos U2, U5 y U6 para nuevos ciclos de *splicing* (Konarska et al., 2006).

Se pueden clasificar dos tipos de procesamiento del pre-ARNm, el *splicing* constitutivo (SC) y el *splicing* alternativo. En el SC sólo un set de sitios de *splicing* es utilizado en todos los pre-ARNm sintetizados para un determinado gen. Esto implica que sean siempre los mismos exones los que componen el ARNm. En el SA se utilizan diferentes combinaciones de sitios de *splicing*, resultando en la producción de pre-ARNm diferentes para un mismo gen, dando como resultado dos o más ARNm maduros diferentes (Smith & Valcarcel, 2000). Así, el SA se constituye como un proceso que aumenta la diversidad del transcriptoma y proteoma de un organismo. El SA permite también regular los niveles de los transcriptos produciendo isoformas de ARNm inestables, las cuales pueden ser degradadas mediante un proceso denominado “degradación mediada por codones de terminación prematuros” (NMD, del inglés *Nonsense-Mediated Decay*) (McGlinchey et al., 2008; Kalyna et al., 2012). Las proteínas generadas por variantes de *splicing* pueden exhibir funciones alteradas como así también cambios en su estabilidad y/o en la localización sub-celular (Chen & Manley, 2009).

1.8.3. Las plantas y el *splicing* alternativo.

Hace varios años atrás el SA en plantas era sobre-estimado dado que existían pocos ESTs (del inglés *Expressed Sequence Tags*) disponibles públicamente para *Arabidopsis*, en comparación con los que se encontraban disponibles para ratones y humanos. Durante los últimos años ha ido incrementando el interés en el estudio del *splicing* alternativo en plantas (Filichkin et al., 2010). De forma similar a lo que ocurre en mamíferos, el SA se ha vuelto más prevalente de lo que se pensaba originalmente, aumentando de un 3% a más de un 35% en tan sólo tres años, a medida que las secuenciaciones se fueron tornando más disponibles (Fig.1.8.3.1.) (Filichkin et al., 2010). Estas evidencias junto con numerosos ejemplos de eventos de SA con funciones importantes, ponen de manifiesto al SA como un proceso crucial en el desarrollo de las plantas y vital en las respuestas a las señales ambientales percibidas por las mismas.

El 60% de los genes multiexónicos en *Arabidopsis thaliana* sufre SA, sugiriendo un rol importante de este mecanismo en los procesos biológicos. El conocimiento acerca del número de genes que sufren de SA en plantas ha ido aumentando en la última década (Brett et al., 2002; Haas et al., 2003; Kikuchi et al., 2003; Iida et al., 2004; Ner-Gaon et al., 2004; Nagasaki et al., 2005; Campbell et al., 2006; Wang & Brendel, 2006; Filichkin et al., 2010; Marquez et al., 2012), en parte gracias las nuevas tecnologías de secuenciación del ARN (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) (Fig.1.8.3.1.).

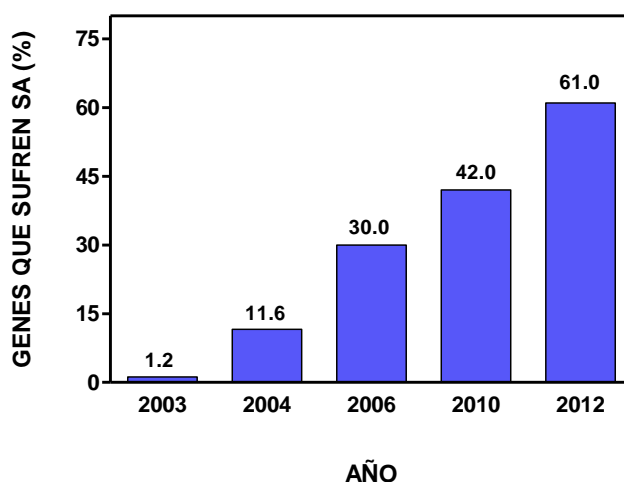


Fig.1.8.3.1. Aumento en la frecuencia de ocurrencia del *splicing* alternativo en *Arabidopsis thaliana* a lo largo del tiempo. En el año 2003 se estimaba que sólo un 1.2% de los genes sufría de SA (Zhu et al., 2003). En años posteriores (2004-2006), los incrementos en desarrollos de nuevas tecnologías (como el desarrollo de librerías de ESTs o cDNAs) permitió el avance en el descubrimiento de nuevos eventos de SA (Wang & Brendel, 2006; Lidia et al., 2004; Xiao et al., 2005; Campbell et al., 2006). El advenimiento de otras tecnologías de alto rendimiento (Filichkin et al., 2010; Marquez et al., 2012) permitió seguir avanzando en la identificación de nuevos eventos de SA, en casi 60 veces que en los últimos 10 años. Tomado de Syed et al, 2012.

Los eventos de SA se pueden agrupar en cuatro categorías que, en conjunto, abarcan todas las posibles combinaciones de las variantes de *splicing*: salteo de exón (del inglés *Exon skipping*), retención de intrón (del inglés *Intron retention*) y uso de un sitio de *splicing* 5'SS o un 3'SS alternativo (Stamm et al., 2005) (Fig.1.8.3.2.).

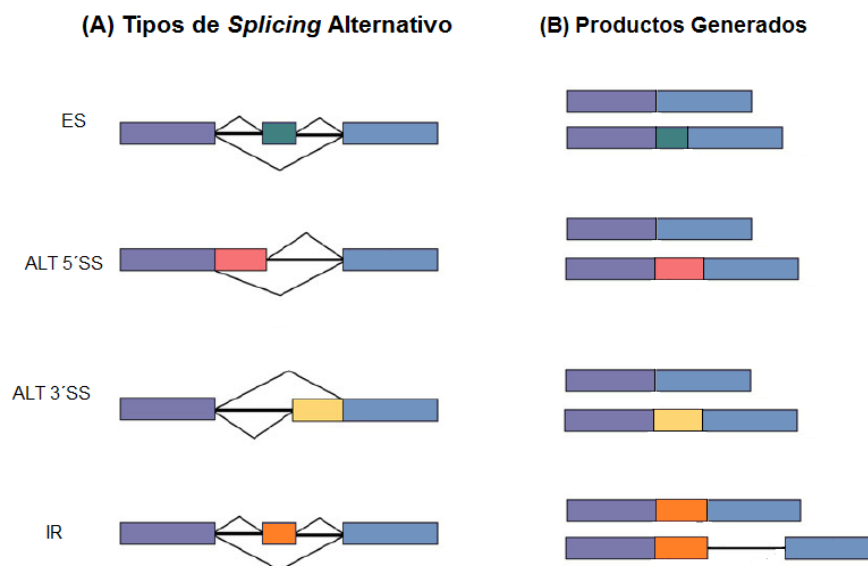


Fig.1.8.3.2. Tipos de eventos de *splicing* alternativo en *Arabidopsis thaliana*. (A) Esquema de los principales tipos de *splicing* alternativo. Los exones y los intrones están representados por cuadrados y líneas horizontales, respectivamente. (B) Productos generados del SA (ARNm). Las líneas diagonales indican los eventos de *splicing* alternativo. ES: salteo exónico, ALT5'SS: sitios dadores de *splicing*, ALT3'SS: sitios aceptores de *splicing*, IR: retención de intrón, Adaptado de Carvalho et al., 2012.

Aproximadamente entre un 45-56% de los genes de *Arabidopsis* que sufren SA presentan retención de intrón (Ner-Gaon et al., 2004; Campbell et al., 2006; Wang et al., 2006; Barbazuk et al., 2008), que se diferencia mecanísticamente de las otras posibilidades en que no involucra una competencia entre distintos sitios dadores y aceptores de *splicing*. Por otra parte, sólo un 8% de los eventos de SA que ocurren en plantas involucran el salteo exónico (inclusión/exclusión de un exón). Alt3'SS y Alt5'SS conforman entre un 22% y 10% de los eventos, respectivamente. En plantas, la ocurrencia de mutaciones que afecten el sitio de *splicing* o cualquier error que pueda ocurrir durante el *splicing* en sí, son más propensos a provocar que un intrón sea retenido.

La mayor parte de los genes que sufre SA en *Arabidopsis* codifica proteínas con funciones regulatorias. Más aún, los genes asociados a respuestas frente a estrés son particularmente propensos a poseer *splicing* alternativo, tanto en plantas como en animales (Kazan, 2003). Sin embargo, se han investigado pocos eventos de SA en términos de profundizar su impacto sobre el desarrollo de las plantas, el mecanismo

molecular por el cual es regulado o la funcionalidad de las diferentes proteínas generadas.

1.8.4. Ejemplos de genes asociados a la dormición y germinación de las semillas que hacen *splicing* alternativo.

En las semillas existen ejemplos muy atractivos de genes que presentan *splicing* alternativo. Por ejemplo, *DOG1* (Bentsink et al., 2006; Nakabayashi et al., 2015). Frecuentemente, los genes que son *spliceados* alternativamente también son sujetos de corte y poliadenilación alternativos (Di Giammartino et al., 2011; Cyrek et al., 2016), cambiando así las regiones 3' de los ARNm como lo hace *DOG1* (Cyrek et al., 2016) y su expresión también sería controlada por un transcripto anti-sentido que actúa en *cis* (Fedak et al., 2016). *DOG1* presenta 5 variantes diferentes (Bentsink et al., 2010; Nakabayashi et al., 2015). Se ha demostrado además que es necesario el componente NTR1 del *spliceosoma* para una correcta transcripción y *splicing* de *DOG1* (Dolata et al., 2015). Este SA es necesario para que se acumulen altos niveles de proteína, ya que si se expresan las isoformas de forma individual, éstas no son capaces de acumular eficientemente los niveles de proteína (Nakabayashi et al., 2015). El gen *DOG1* de *Arabidopsis* consta de tres exones. El intrón 2 es alternativamente *spliceado* y presenta sitios de *splicing* 3' y 5', lo que da origen a 4 de las 5 variantes: *DOG1-α*, *DOG1-β*, *DOG1-γ*, and *DOG1-δ* (Bentsink et al., 2006). La quinta variante, *DOG1-ε*, carece completamente del tercer exón (Fig.1.8.4.1.) (Nakabayashi et al., 2015). Se sabe que *DOG1* presenta un pico de expresión durante la fase media de la maduración de las semillas y que se reduce completamente en semillas secas maduras (Bentsink et al., 2006; Nakabayashi et al., 2012). Los niveles del transcripto *DOG1-ε* representan cerca del 90-95% durante el período de maduración comprendido entre 10 y 20 días posteriores a la polinización (Nakabayashi et al., 2015). Las tres isoformas de *DOG1* tienen localización nuclear, lo que sugiere que son capaces de reconocerse (Nakabayashi et al., 2012, 2015). Sin embargo, se desconocen los reguladores específicos del procesamiento de este gen y menos aún se sabe de su regulación por luz.

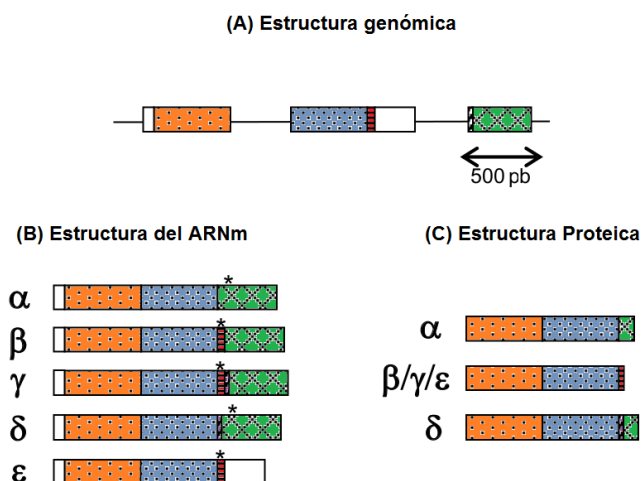


Fig.1.8.4.1. Variantes de *splicing* alternativo de *DOG1* en *Arabidopsis*. (A) Estructura genómica de *DOG1*. (B) Estructuras del ARNm. (C) Estructuras proteicas. Los rectángulos representan los exones y el asterisco el codón de stop. Adaptado de Nakabayashi et al., 2015.

Como se ha mencionado previamente, el ABA regula la maduración y dormición de las semillas. La vía de señalización del ABA involucra, entre otros, la expresión de 4 genes centrales que modulan la maduración y cuyas funciones son parcialmente redundantes: *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON 1*), *LEC2*, *FUS3* (*FUSCA 3*) y *ABI3* (Kroj et al., 2003; To et al., 2006). *ABI3* es el componente principal de la vía de señalización del ABA y es altamente conservado en varias especies de plantas. La proteína *ABI3* contiene cuatro dominios funcionales (Giraudat et al., 1992; Suzuki et al., 1997). En *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Pisum sativum*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum* se ha identificado que los genes *ABI3/VP1* son regulados mediante *splicing* alternativo (McKibbin et al., 2002; Fan et al., 2007; Gagete et al., 2009; Sugliani et al., 2010; Gao et al., 2013), lo que genera múltiples transcritos mal empalmados que usualmente codifican proteínas truncadas. En arroz y trigo esto está asociado a una reducción en la calidad de los granos (McKibbin et al., 2002; Fan et al., 2007). En *Arabidopsis*, *ABI3* presenta dos variantes de *splicing* diferentes: *ABI3- α* (presenta secuencia codificante completa y por tanto codifica para la proteína completa) y *ABI3- β* (contiene un intrón críptico en el primer exón que causa un cambio en el marco de lectura y por tanto codifica para una proteína truncada) (Sugliani et al., 2010). El *splicing* de *ABI3* es regulado durante el desarrollo, con una acumulación de *ABI3- β* solo durante la etapa final de maduración de la semilla. Esto probablemente contribuya a una rápida regulación negativa de la proteína *ABI3* en semillas maduras, lo cual es necesario para inhibir el programa de maduración de las semillas en semillas que están germinando (Sugliani et al., 2010).

El factor de transcripción *PIF6/PIL2* modula el control de la dormición en semillas de *Arabidopsis* (Penfield et al., 2010). *PIF6* se expresa durante el desarrollo de la semilla y su expresión disminuye severamente durante la imbibición. El pre-ARNm de *PIF6* produce dos transcritos alternativos que resultan de un evento de saltado exónico, siendo *PIF6- α* la isoforma que codifica la proteína completa, y *PIF6- β* (que

carece del exón 3) la isoforma que codifica una proteína truncada que carece del dominio bHLH. A pesar que la proteína truncada no interactúa con el DNA o con otros factores de transcripción del tipo bHLH, ambas isoformas retienen la habilidad de unión al fitocromo (Penfield et al., 2010). Esta diferencia estructural entre ambas isoformas lleva a la expresión de diferentes fenotipos (Fig.1.8.4.2.). Mientras altos niveles de *PIF6-α* no tienen efectos en la germinación, líneas que sobre-expresan la isoforma *PIF6-β* muestran mayores niveles de germinación comparadas al genotipo salvaje, indicando un rol de esta isoforma en la promoción de la germinación. Sin embargo, ambas isoformas son capaces de inhibir la elongación del hipocotilo de igual forma bajo la luz R (Penfield et al., 2010). Estos resultados sugieren que las variantes de *splicing* del factor de transcripción PIF pueden tener funciones biológicas diferenciadas según el proceso biológico.



Fig.1.8.4.2. Variantes de *splicing* alternativo de *PIF6* en *Arabidopsis*. (A) Estructura del ARNm de las dos variantes de *splicing* de *PIF6* detectadas en semillas. (B) Dominios presentes en las proteínas codificadas por *PIF6-α* y *PIF6-β*. Adaptado de Penfield et al., 2010.

Estos ejemplos sugieren que las semillas son un excelente sistema de estudio para estudiar el *splicing* alternativo. Sin embargo, más allá de ejemplos puntuales, no hay hasta la fecha trabajos publicados sobre análisis globales y funcionales de SA en semillas inducidas a germinar por luz.

1.9. EL RELOJ CIRCADIANO DE LAS PLANTAS COMO INTEGRADOR DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS Y TÉRMICAS EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.

La capacidad de las plantas de regular distintos procesos fisiológicos y del desarrollo a lo largo del día y frente al cambio de estaciones durante el año, es posible gracias a un oscilador interno conocido como reloj circadiano. Este reloj es a su vez sincronizado por los ciclos de luz/oscuridad percibidos por los fitocromos y los criptocromos, lo que permite que el reloj mantenga una relación de fase estable con el amanecer y/o atardecer, a pesar de los cambios estacionales en la duración del día. El reloj circadiano está compuesto por genes que forman circuitos de retroalimentación positiva y negativa de 24 horas de duración. Estos circuitos están regulados a diferentes

niveles: epigenético, transcripcional, post-transcripcional, y post-traduccion. El funcionamiento de los relojes circadianos se puede describir mediante un modelo sencillo (Fig.1.9.1.), donde un estímulo entrante o “*input*” (luz y cambios de temperatura, entre otros) interacciona con el oscilador central, del cual se obtiene como resultado un “*output*” o respuesta (cambios en la expresión de genes, movimiento de hojas, apertura estomática y germinación, entre otros). *Arabidopsis thaliana* exhibe innumerables “*outputs*” del reloj circadiano: el alargamiento del hipocotilo, la posición de las hojas y la tolerancia a distintos tipos de estrés abióticos, entre otros. Así también a nivel molecular, el reloj circadiano regula la expresión de miles de genes (Yanovsky & Kay., 2001; Yanovsky et al., 2002; McClung, 2006; Nazue & Maloof., 2006).

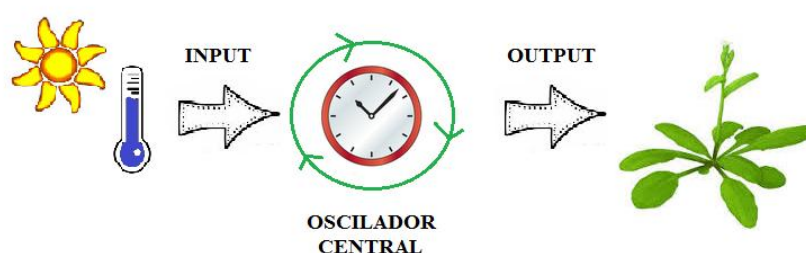


Fig.1.9.1. Modelo generalizado del oscilador central. Los ciclos diarios y estacionales de luz y temperatura son percibidos a través del reloj circadiano. Este sistema circadiano está compuesto por un oscilador central autónomo el cual es ajustado por variables ambientales como la luz y la temperatura. Estas señales serán las que sincronicen los ciclos del oscilador central con el medio externo. El oscilador central genera ritmicidad circadiana en varios procesos fisiológicos u *outputs*. Estos *outputs* del reloj se dan a distintos niveles de organización; por ejemplo, pueden consistir en respuestas fisiológicas (apertura y cierre de estomas, entre otras) o moleculares (expresión cíclica de genes). Sol: representa la luz; Termómetro: representa la temperatura; *Input*: estímulo entrante; *Output*: respuesta.

En *Arabidopsis thaliana* el oscilador central está compuesto por los genes *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*), *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) y *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*). *CCA1* y *LHY* son proteínas estrechamente relacionadas y cada una posee un motivo “MYB-related DNA-binding motif”. Los niveles de ARNm transcritos a partir de estos genes oscilan con un patrón similar, exhibiendo su pico de expresión justo después del amanecer. *TOC1* pertenece a una familia de proteínas denominadas PRR por “Pseudoresponse Regulators” y posee un motivo característico y específico de plantas llamado *CCT*. El nivel de ARNm de *TOC1* oscila exhibiendo su pico de expresión en el ocaso (Hayama & Couplan., 2003). *TOC1* actúa como represor de *CCA1* y *LHY*, y estos últimos a su vez reprimen la expresión de *TOC1*, formando un mecanismo de represión transcripcional (Pokhilko et al., 2012). Con el tiempo se han descubierto más componentes del reloj que conforman otros circuitos que interactúan con el oscilador central. A estos componentes se los clasifica de acuerdo al momento del día donde alcanzan su pico máximo de expresión,

definiendo de esta forma dos grupos de genes: (1) los que se expresan por la mañana (*morning expressed*) y (2) los que se expresan por la tarde (*evening expressed*) (Pruneda-Paz & Kay., 2010). De esta forma en un circuito de genes que se expresan por la mañana, *CCA* y *LHY* promueven la expresión de dos miembros de la familia de *TOC1*: *PRR9* y *PRR7*, uniéndose directamente a sus promotores (Farre et al., 2005; Nakamichi et al., 2010). A su vez, *PRR9*, *PRR7* y *PRR5* funcionan como represores transcripcionales corregulando la expresión de *CCA1* y *LHY* (Fig.1.9.2.).

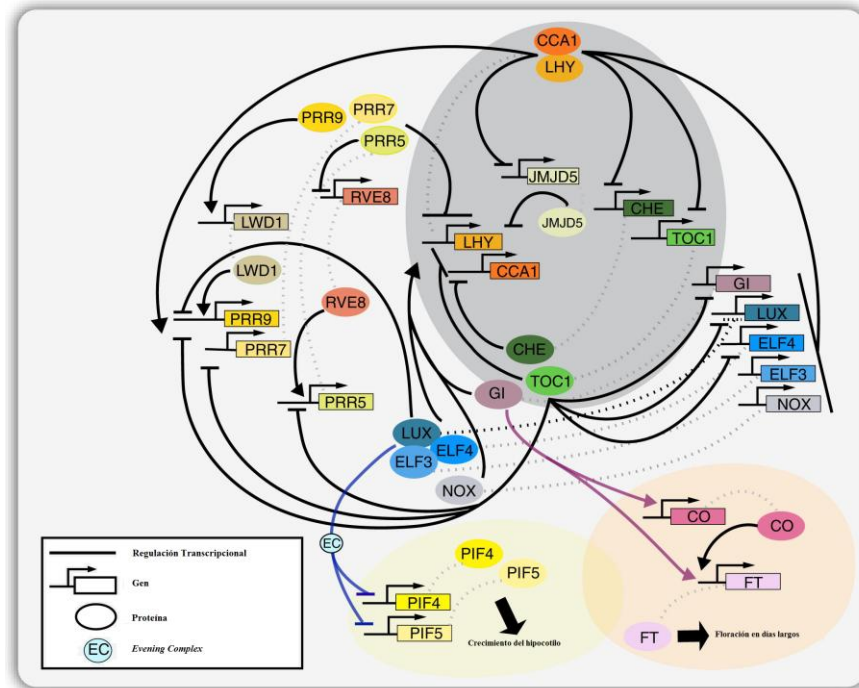


Fig.1.9.2. Modelo del reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*. Este modelo se basa en la información del control transcripcional de sus componentes. *Evening complex*: complejo de proteínas que se expresan por la tarde. Tomado y modificado de Nagel & Kay, 2012.

En semillas de numerosas especies vegetales, la germinación puede estar influenciada por la duración de día (Baskin & Baskin., 1976; Black & Wareing., 1954; Black & Wareing., 1955; Densmore., 1997) y sugiere que el sistema circadiano podría estar activo en las semillas. Por otra parte, se ha documentado que la imbibición de semillas de *Arabidopsis* sincroniza la expresión génica modulada por el reloj (Zhong et al., 1998) y que más del 40% de la expresión génica regulada por las hormonas ABA y GA está bajo el control del reloj circadiano (Covington et al., 2008). En este trabajo se observó que, hacia el anochecer, los genes de la vía del ABA son regulados negativamente y los genes de la vía de las giberelinas son regulados positivamente. Por otra parte, el reloj circadiano puede ser entrenado o modulado por luz, temperatura y nitratos (McClung, 2006; Gutierrez et al., 2008), señales ambientales que también pueden terminar la dormición en semillas de muchas especies. Por ejemplo, la

promoción de la germinación por la exposición a un breve RLP mediada por phyA fluctúa aproximadamente en períodos de 24 horas, sugiriendo que el reloj circadiano podría estar involucrado en la germinación por luz de las semillas (Oliverio et al., 2007).

Penfield & Hall (2009) demostraron que el reloj circadiano puede actuar como un integrador de señales ambientales que regulan la salida de la dormición y la promoción de la germinación de las semillas. Mediante aproximaciones con mutantes de genes del reloj, demostraron que semillas que no expresan genes del reloj como *LHY*, *CCA1*, *GI*, *ZTL* y *LUX* tienen fenotipos más dormidos que el genotipo salvaje sugiriendo que son genes que promueven la germinación en ciertas condiciones de imbibición. Adicionalmente observaron que los genes del reloj son esenciales en la regulación de la transcripción de las enzimas asociadas al metabolismo del ABA y las GAs como *CYP707A2* y *NCED*.

1.10. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA TESIS.

La luz es una fuente de información importante para las semillas. Si bien existen muchos niveles de regulación génica modulados por los fotorreceptores, no hay información disponible sobre la regulación a nivel de *splicing* del ARN mensajero por luz en semillas. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que este proceso es importante en la regulación de varios procesos fisiológicos (McKibbin et al., 2002; Balasubramanian et al., 2006; Fan et al., 2007; Penfield et al., 2010). Hay evidencias experimentales que demuestran que los fitocromos regulan el SA en plántulas de *Arabidopsis* (Shikata et al., 2014; Hatmann et al. 2016; Wu et al., 2014). Más recientemente, Srinivasan et al. (2016) demostraron que el SA cambia en semillas secas y embebidas durante la maduración de las semillas. Esta tesis se propone continuar avanzando en el estudio de los procesos de *splicing* alternativo asociados a la inducción de la germinación por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*. Nuestra hipótesis de trabajo es que la regulación por luz del *splicing* alternativo actúa como un mecanismo molecular que confiere un nivel adicional de regulación génica para el ajuste de la salida de la dormición de las semillas por luz.

Como se ha mencionado en las secciones previas, las temperaturas alternadas y la luz son dos señales que promueven la salida de la dormición en las semillas de muchas especies. Sin embargo, los mecanismos moleculares de su interacción en las semillas aún están poco esclarecidos. En esta tesis proponemos que algunos componentes del reloj circadiano podrían ser relevantes para la integración de señales asociadas a los ciclos diarios de temperaturas alternadas en oscuridad previos a la inducción de la germinación por luz en semillas de *Arabidopsis*. La sincronización de ambas señales ambientales podría tener consecuencias ecológicas y adaptativas para el ajuste de la germinación de las semillas en el campo.

La dormición de las semillas es una característica indeseable en los cultivos agrícolas, en donde se requieren una rápida germinación y crecimiento de los mismos. Sin embargo, un cierto nivel de dormición es conveniente, por lo menos durante el desarrollo de la semilla en la planta madre. Por ejemplo, en los cultivos de cereales, las

semillas de ciertos genotipos pueden germinar en la planta madre, proceso que se conoce como brotado pre-cosecha que puede causar graves perjuicios económicos (Del Fueyo et al., 2003). La ausencia de dormición provoca viviparismo en algunas especies agrícolas provocando grandes pérdidas económicas, como sucede en el trigo, al producir una baja calidad del grano. Pero una dormición muy profunda también tiene consecuencias económicas negativas, como sucede en la germinación desigual de campos de cebada que impide la correcta formación de malta, o como ocurre en muchas especies forestales utilizadas en repoblaciones forestales y en la industria maderera. Por ello existe un gran interés científico y económico en conocer los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en el control de la terminación de la dormición. Esta tesis pretende contribuir generando conocimiento en algunos aspectos importantes del control de la dormición por luz y temperatura utilizando a las semillas de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

CAPÍTULO 2.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EVENTOS DE *SPLICING* ALTERNATIVO ASOCIADOS A LA PERCEPCIÓN POR LUZ ROJA EN SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*.

2.1. INTRODUCCIÓN.

En *Arabidopsis*, tanto la salida de la dormición como la promoción de la germinación mediada por la luz se encuentran reguladas por acción de los fitocromos (Bae & Choi, 2008). Si bien ambos procesos pueden mediar tanto por el phyA como por el phyB, los mecanismos moleculares involucrados no son idénticos. Mientras que la información acerca de las vías de acción del phyB durante estos procesos es abundante (Penfield et al., 2005; Oh et al., 2006; Oh et al., 2007; Kim et al., 2008; Oh et al., 2009; Gabriele et al., 2010; Park et al., 2011), poco se conoce acerca del modo en que el phyA media dicho fenómeno (Ibarra et al., 2013). Un elemento central de las vías de acción del phyB es PIF1/PIL5, que reprime la germinación de forma directa o indirecta a través de las proteínas RGA, GAI y SOMNUS, entre otras (Oh et al., 2007; Kim et al., 2008; Gabriele et al., 2010; Park et al., 2011). La promoción de la germinación por luz R mediada por el Pfr de phyB tiene lugar a través de PIF1/PIL5 (Oh et al., 2009). El phyA también puede unirse a PIF1/PIL5 e inducir su degradación. Estos datos sugieren que PIF1/PIL5 también participa en la promoción de la germinación mediada por el phyA (Seo et al., 2009). Sin embargo, se han reportado evidencias experimentales sugiriendo que factores independientes a PIF1/PIL5 serían necesarios para inducir la germinación por phyA. Penfield et al. (2010) observaron que semillas *pil5* con bajos niveles de dormición responden de forma diferente cuando son expuestas a luz RL vs cuando son mantenidas en oscuridad, sugiriendo que la germinación mediada por phyA es parcialmente independiente de PIF1/PIL5.

El análisis del transcriptoma indica que 55% de los genes regulados por phyA en semillas irradiadas con luz RL son distintos a los que están asociados PIF1/PIL5 cuando la germinación es promovida por luz R (Ibarra et al., 2013).

Si bien el conocimiento que tenemos acerca del transcriptoma promovido por luz en semillas de *Arabidopsis* es bastante completo (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013), aún desconocemos la importancia de la regulación post-transcripcional en la promoción de la germinación por luz en semillas. En este sentido, la regulación post-transcripcional representa un nivel regulatorio adicional que ocurre en las células y que puede afectar la respuesta fisiológica. Durante los últimos años, el conocimiento generado acerca de la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional fue incrementándose. El SA es un proceso de regulación post-transcripcional que contribuye a generar diversidad en el transcriptoma y proteoma mediante la producción de múltiples ARNm y proteínas a partir de un único gen (Barbazuk et al., 2008; Marden, 2008). El SA es un proceso nuclear que se lleva a cabo en todos los eucariotas, por medio del cual se eliminan los intrones y se unen covalentemente los exones. Un mismo pre-ARNm puede generar diferentes isoformas de ARNm, abarcando todas las posibles combinaciones de las variantes de *splicing*: salteo de exón, retención de intrón, y uso de un sitio de *splicing* 5'SS o un 3'SS alternativo. Las isoformas generadas a partir de un mismo gen pueden contener o no secuencias específicas, que incluyen dominios funcionales, regulatorios y de interacción. Así, el ARNm y las proteínas producidas pueden variar en términos de estabilidad, localización sub-celular, estructura, interacciones proteína-moléculas, regulación y función (Severing et al., 2012; Syed et al., 2012). En las plantas, el SA regula la expresión de numerosos genes involucrados en varios aspectos del crecimiento y desarrollo (Lightfoot et al., 2008; Matsumura et al., 2009; Sanchez et al., 2010; Martin-Trillo et al., 2011; James et al., 2012; Jones et al., 2012; Rosloski et al., 2013). También hay evidencias que demuestran que los eventos de SA son importantes en las respuestas de las plantas al estrés biótico y abiótico (He et al., 2007; Mazzucotelli et al., 2008; Hirayama et al., 2010; Matsukura et al., 2010; Mastrangelo et al., 2012; Jia et al., 2013; Staiger et al., 2013). Más aún, el SA es funcional en muchos aspectos del metabolismo celular (DeRidder et al., 2012), la actividad enzimática (Hasse et al., 2009; Brummell et al., 2011) y la localización sub-celular de las enzimas (Puyaubert et al., 2008; Dixon et al., 2009; Lamberto et al., 2010; Kriechbaume et al., 2012; Wiszniewski et al., 2012). Se ha propuesto que la presencia de SA en la regulación de los procesos de floración mediada por temperatura, modulación de los componentes del reloj circadiano y maduración, dormición y germinación de las semillas contribuye a la adaptación de las poblaciones a distintos ambientes (McKibbin et al., 2002; Balasubramanian et al., 2006; Fan et al., 2007; Penfield et al., 2010) (Fig.2.1.1.).

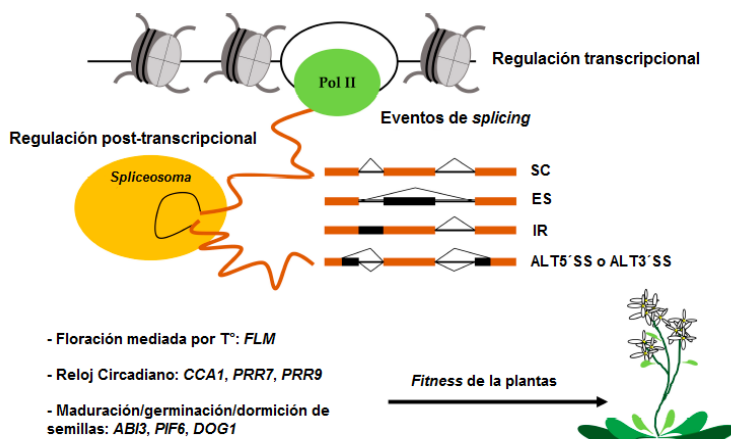


Fig.2.1.1. Regulación del SA y su impacto durante el desarrollo de las plantas. Durante la transcripción génica se inicia el procesamiento del pre-ARNm. A medida que los pre-ARNm son generados por medio del proceso de transcripción, los mismos van siendo procesados dando lugar a los ARNm maduros. Uno de los eventos de procesamiento del pre-ARNm más importantes es el *splicing*. Este es un proceso nuclear que se lleva a cabo en todos los eucariotas, por medio del cual se eliminan los intrones y se unen covalentemente los exones. Un mismo pre-ARNm puede generar diferentes isoformas de ARNm mediante el *splicing* alternativo, abarcando todas las posibles combinaciones de las variantes de *splicing*: salteo de exón, retención de intrón, y uso de un sitio de *splicing* 5'SS o un 3'SS alternativo. Dada la naturaleza sésil de las plantas, éstas deben adaptarse de forma rápida a los cambios producidos en el ambiente que las rodea para asegurar la supervivencia. Así, el SA se constituye como un proceso importante del control del *fitness* de las plantas. SC: *splicing* constitutivo, ES: salteado exónico, IR: retención de intrón, ALT5'SS: sitios 5'alternativos de *splicing*, ALT3'SS: sitios 3'alternativos de *splicing*, T°: temperatura., Pol II: ARN polimerasa II. Adaptado de Shang et al., 2017.

Durante la desecación de las semillas, se inician una serie de respuestas fisiológicas y moleculares asociadas con la imposición de la dormición y la adquisición de la tolerancia a sequía, asegurándose así la viabilidad y una germinación exitosa (Blochl et al., 2005; Gutierrez et al., 2007; Finkelstein et al., 2008; Angelovici et al., 2010). Los procesos que ocurren durante el desarrollo del embrión y la maduración de la semilla se encuentran regulados en múltiples niveles. En las semillas, el SA también es relevante durante las etapas tempranas (Fouquet et al., 2011) y tardías (Sugliani et al., 2010) del desarrollo del embrión. En especies de interés comercial como el arroz (*Oryza sativa*), la reducción en el procesamiento de los transcritos de *OsVP1* (*VIVIPAROUS 1*) contribuye a una germinación temprana de los granos en variedades susceptibles al brotado produciendo el fenómeno conocido como brotado pre-cosecha (Fan et al., 2007). En el caso del trigo (*Triticum aestivum*), variaciones en los productos génicos de *VP1* causado por procesamientos diferenciales del pre-ARNm contribuyen a una reducción en los niveles de dormición del embrión y al brotado pre-cosecha (McKibbin et al., 2002; Wilkinson et al., 2005). Muy recientemente Srinivasan et al. (2016) evaluaron la expresión génica y el SA a nivel transcriptómico en semillas que están madurando en las silicuas de la planta madre a 14 y 20 días desde polinización (DAP). Allí identificaron que 34% de los genes expresados durante la maduración de las

semillas tienen SA, muchos de los cuales se expresan de forma específica en los tejidos de las semillas. Del 34% de los genes que hacen SA, un 88% de los eventos de SA identificados no habían sido descritos anteriormente y un 6% de los transcritos sufren modificación post-transcripcional por SA y no están sujetos a regulación transcripcional durante la desecación. Se ha demostrado también que el SA es un evento importante durante la germinación en otras especies como la cebada (Zhang et al., 2016). Mediante el análisis del transcriptoma de embriones de cebada embebidos durante 24 o 48 horas a 21°C en oscuridad, se identificaron entre 552 y 669 transcritos comunes en embriones de cuatro variedades de cebada. Dichos transcritos son en su mayoría componentes de los ribosomas, componentes de la maquinaria de transporte del ARN, el *spliceosoma*, transducción de señales hormonales, glicólisis y metabolismo de azúcares y carbonos.

A pesar de que la luz es una señal relevante para la inducción de la germinación en semillas de muchas especies expuestas a distintas condiciones ecológicas, hay una falta absoluta de información sobre la regulación a nivel de *splicing* del ARNm en el fotocontrol de este proceso. En este capítulo, se analiza el SA a nivel global de expresión en semillas de *Arabidopsis* que germinan con luz R.

2.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Objetivos particulares:

1. Analizar el perfil de expresión global de ARNm e identificar transcritos que se expresen diferencialmente en semillas inducidas a germinar con un pulso de luz R o RL, mediante la técnica RNAseq.
2. Identificar y estudiar genes y variantes de *splicing* alternativo que se expresan en semillas inducidas a germinar por luz R.

Hipótesis general:

El *splicing* alternativo es un mecanismo relevante en las semillas inducidas a germinar por luz y confiere un nivel adicional de regulación génica para un grupo de genes significativos.

Hipótesis asociadas:

1. Una fracción significativa de genes promovidos por luz presentan *splicing* alternativo.
2. El fitocromo B es el fotorreceptor responsable de promover el *splicing* alternativo de los genes inducidos diferencialmente por luz.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.3.A. Condiciones de cultivo de las plantas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 fueron sembradas en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) transparentes conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada y se incubaron a 5 °C en durante 7 días. Transcurrido ese período, se les dio un pulso saturante de rojo (Rp) de 2 horas, volviendo luego a oscuridad por 24 horas a 25 °C. Finalmente, se expusieron a luz blanca para promover su crecimiento y ser luego trasplantadas en recipientes plásticos de 110 cm³ con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (proporción 2:2:1). Las plantas fueron regadas durante su ciclo de vida con una solución nutritiva de Hakaphos (13-40-13+MgO+M.E). Las plantas fueron cultivadas en condiciones de día largo (16h luz/8h oscuridad, 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54) con temperaturas que oscilaron entre 18 °C y 23 °C, hasta el momento de la cosecha. Las semillas fueron cosechadas en el momento en que todas las silicuas estuvieran completamente secas y luego fueron almacenadas en tubos abiertos dentro de un recipiente hermético provisto con sílica gel a temperatura constante de 20 °C y oscuridad.

2.3.B. Diseño experimental y ensayos fisiológicos de germinación de las muestras experimentales.

Muestras de 20 semillas se sembraron en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) cada una conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos no deseados por niveles altos de Pfr/P presentes en las semillas secas, las semillas embebidas por 2 horas en oscuridad se irradiaron con un pulso saturante de rojo lejano (RLp, 20 minutos) para reducir la germinación en el tratamiento control de luz RL. Las cajas con las semillas se envolvieron con bolsas plásticas de color negro y se incubaron a 5°C por 3 días. Luego se irradiaron por 20 minutos con un pulso saturante de rojo (Rp, estableciendo una relación Pfr/P de 0,87, 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) o un pulso saturante de RL (estableciendo una relación de Pfr/P de 0.03, 42 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Casal et al., 1991). Luego de los tratamientos de luz, las cajas de plástico con las semillas se incubaron en oscuridad a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la observación de la radícula a simple vista.

2.3.C. Secuenciación global del ARN.

2.3.C.1. Diseño experimental y extracción de las muestras utilizadas para la secuenciación: se sembraron 3 muestras biológicas de semillas Col-0 (5 mgs cada una) para cada tratamiento lumínico (Rp y RLp) sobre papel de filtro embebido en agar-agua 0,8 % (p/V). El protocolo experimental fue igual al mencionado en el punto 1.B., pero luego de los pulsos saturantes de luz, las semillas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 14 hs, momento en el que se procedió a la cosecha de las muestras. Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la extracción del ARN.

2.3.C.2. Extracción y cuantificación del ARN: se realizó la extracción y secuenciación del ARN de 3 muestras biológicas para cada uno de los tratamientos lumínicos. El ARN total de semillas fue extraído utilizando el kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) siguiendo las indicaciones del

fabricante. El RNA fue eluído en un volumen final de elución de 50 μL . Se determinaron la calidad y concentración ARN mediante espectrofotometría y gel de agarosa. Para cuantificar el ARN mediante espectrofotometría se utilizaron 2 μL de muestra diluida en 398 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos presentan su máximo de absorción a 260 nm y que las proteínas lo hacen a 280 nm, se evaluó la relación de absorbancias en estas dos longitudes de onda para determinar la pureza del material genético (relación 260/280). Una relación óptima de trabajo ronda el valor de 1.8. Se procedió luego a la determinación de la calidad del ARN mediante la corrida en un gel de agarosa 2% con Bromuro de Etidio con el fin de descartar la posible presencia de ADN en la muestra o bien de ARN degradado.

2.3.C.3. Protocolo utilizado para la generación de las bibliotecas de ADN copia y la secuenciación masiva del transcriptoma: luego de la extracción de ARN total, las muestras se mandaron para el procesamiento al Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR, Rosario). Para la secuenciación de las bibliotecas se procedió a utilizar la tecnología de *pair-end sequencing* en un secuenciador Illumina HiSeq1500. Se secuenciaron tres réplicas biológicas para cada tratamiento lumínico.

2.3.C.4. Mapeo de las lecturas: las lecturas de las secuencias fueron mapeadas al genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (Lamesch et al., 2012) utilizando TopHat v2.0.9 (Trapnell et al., 2009), con los parámetros por defecto, a excepción del máximo de longitud de intrón, seteado a 5000 pares de bases. Finalmente, a partir de los archivos de alineación (archivos bam) generados y empleando scripts de R (Team RDC., 2008) creados en el laboratorio del Dr. Marcelo Yanovsky, se obtuvieron las tablas de cuentas (counts) que permitieron analizar expresión diferencial y procesamiento alternativo de pre-ARNm, en base al transcriptoma del TAIR10.

2.3.C.5. Análisis de expresión diferencial: la normalización y análisis estadístico de cada lectura se realizó utilizando el paquete edgeR v3.4.2 (Robinson et al., 2010) y los p-valores resultantes se ajustaron utilizando el criterio del *false discovery rate* (FDR, Benjamini et al., 1995). En esta tesis se procedió a utilizar como genes expresados diferencialmente a aquellos genes con valores de $\text{FDR} < 0.05$ y valor de logFC (Fold Change) $\geq |1|$.

2.3.C.6. Análisis bioinformáticos del perfil transcripcional: para identificar las categorías funcionales asociadas a grupos específicos de genes se usó la herramienta Classification SuperViewer Tool, del Bar Toronto (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi). Se representan los valores de P de la distribución de las categorías sobre-representadas, utilizando como valor de corte $p \leq 0.05$. Se calculó el factor de representación (FR) y la probabilidad que las superposiciones entre grupos de genes sean por azar utilizando la página web http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html. Se define como factor de representación al número de genes en común observado dividido por el número de genes en común esperado de la superposición de dos grupos independientes de genes. Un factor de representación mayor a 1 indica mayor solapamiento de lo esperado por azar en dos grupos independientes de genes mientras que un factor de representación menor que 1 indica un menor solapamiento que lo esperado. La probabilidad de cada solapamiento se determinó usando la fórmula de probabilidad hipergeométrica con un valor de $P \leq 0,05$.

2.3.D. Análisis de eventos de *splicing* alternativo.

*2.3.D.1. Análisis de eventos de *splicing* alternativo:* la normalización y análisis estadístico de cada lectura se realizó utilizando el paquete edgeR v3.4.2 (Robinson et al., 2010) y los valores de P resultantes se ajustaron utilizando el criterio del *false discovery rate* (FDR, Benjamini et al., 1995). En esta tesis se procedió a utilizar valores de $FDR < 0.15$. Luego se filtró por una diferencia de PIR (del inglés *Percent Intron Retention*) o PSI (del inglés *Percent Spliced-In*) entre tratamientos con valor absoluto (es decir, tanto valores positivos como negativos) mayores a 0,1 (10 %) y menores a 0,95 (95 %).

2.3.E. Análisis y validación de eventos de *splicing* alternativo. Cuantificación de abundancia relativa de isoformas.

2.3.E.1. Extracción y cuantificación del ARN: para la extracción de ARN se procedió en líneas generales como está explicado en la sección 2.C.2.

2.3.E.2. Síntesis del ADN copia a partir del ARN obtenido: una vez obtenido el ARN, se procedió a realizar el tratamiento de las muestras con DNasa (para evitar la posible interferencia de ADN contaminante en el ARN obtenido), empleando la enzima RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, Madison, USA). Se utilizó como material de partida 1 µg de ese ARN y se sintetizó el ADNc utilizando la enzima M-MLV Reverse transcriptase (Promega, Madison, USA). El protocolo fue el siguiente: se trató 1 µg de ARN total con una mix de 2 µL de DNasa + 1 µL de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega, Madison, USA). Esta solución fue incubada durante de 30 minutos a 37°C. Luego se añadió con 1 µL de Stop Solution (Promega, Madison, USA) y se incubó durante 10 minutos a 65°C para inactivar la DNasa. A continuación se agregaron 2 µL de oligodT 100 mM y se incubó durante 2 minutos a 65°C para luego incubar esta solución durante 1 minuto en hielo. Finalmente se adicionaron 6,5 µL de la mix de RT (2 µL de MMLV HP RT 10X Reaction Buffer + 2 µL de DTT 100 mM + 1 µL de dNTPs mix 10 mM + 1.5 µL de H₂O_{mq}) y 0.5 µL de M-MLV Reverse Transcriptase Enzyme (200 U/µl), obteniendo un volumen final de reacción de 20 µL. Esta solución se incubó durante 1 hora a 37 °C, 5 minutos a 85 °C y 1 minuto en hielo.

2.3.E.3. Reacciones de PCRs semi-cuantitativas: para obtener los patrones de *splicing* de los diferentes genes se utilizó la técnica de PCR semi-cuantitativa según el siguiente protocolo general: se sembraron 3 réplicas biológicas (5 mg de semillas cada una) de los materiales bajo estudio. Las muestras se cosecharon a las 12 horas posteriores al estímulo lumínico. Una vez cosechadas en nitrógeno líquido, se almacenaron a -80°C hasta proceder a la extracción del ARN. Para ello se utilizó el kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN purificado se sometió a un tratamiento con DNasa empleando la enzima RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, Madison, USA). Se utilizó como material de partida 1 µg de ese ARN y se sintetizó luego el ADN copia utilizando la enzima MMLV High Performance Reverse Transcriptase (Epicentre, Madison, USA) y oligo-dT como *primer*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este ADN copia sirve como molde para realizar las reacciones de PCR semi-cuantitativa. Los *primers* son diseñados para cada gen de forma tal que sean capaces de amplificar las diferentes isoformas derivadas del gen, estableciéndose así una competencia de los moldes con los *primers*, resultando en una mayor abundancia del producto de PCR específico de una

isoforma en particular cuanto más abundante sea como molde en la muestra. Se incubó el ADNc resultante de la retrotranscripción con una mezcla de PCR compuesta por buffer, MgCl₂, primers, dNTPs y la TaqPolimerasa (Invitrogen, Madison, USA). La cantidad de magnesio y el ciclado térmico varió para cada gen evaluado. Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa o policrilamida y la abundancia relativa de las isoformas (bandas en el gel) se cuantificó utilizando el software ImageJ (<https://imagej.net/Welcome>). Con los datos de densitometría se calcularon los valores de los índices de *splicing* como la abundancia de la isoforma más larga relativa a los niveles de todas las isoformas posibles, para cada gen evaluado. Las secuencias de los primers utilizados se encuentran en la Tabla 2.4.5.1.

2.3.F. Análisis de categorías funcionales enriquecidas.

Para identificar las categorías funcionales asociadas a grupos específicos de genes se usó la herramienta BioMaps del software Virtual Plant (Katari et al., 2010). Se utilizó el Test de Fisher como método para calcular el valor de P de las categorías sobre-representadas, utilizando como valor de corte $p \leq 0.01$. Se analizaron las categorías funcionales de nuestro interés, determinando para cada una un factor de representación (FR).

2.3.G. Curva de respuesta al Pfr.

Se sembraron 3 réplicas biológicas de 20 semillas cada una en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) cada una conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas embebidas por 2 horas en oscuridad se irradiaron con un pulso saturante de RL (20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron a 5°C por 3 días. Luego se irradiaron con un pulso de 20 minutos estableciendo diferentes proporciones de Pfr/P (oscuridad, 3, 10, 20, 33, 61 y 87 %). Luego de los tratamientos de luz, las cajas de plástico se envolvieron nuevamente con las bolsas y se incubaron a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la aparición de la radícula a simple vista.

2.4. RESULTADOS.

2.4.1. Perfil transcripcional inducido por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Con el objetivo de analizar el perfil de expresión global de ARNm e identificar transcriptos que se expresen diferencialmente en semillas inducidas a germinar con un Rp o RLp, se realizó un ensayo de expresión global mediante la técnica de RNAseq, utilizando semillas del ecotipo salvaje Col-0. El protocolo experimental utilizado para la secuenciación del transcriptoma fue puesto a punto previamente utilizando diferentes poblaciones de semillas. Dicho protocolo resultó ser muy estable y nos permitió identificar luego el transcriptoma de semillas asociado a la germinación mediada por los fitocromos estables. Las semillas Col-0 fueron incubadas durante 72 horas a 5°C y luego irradiadas con un pulso saturante de 20 minutos de luz R o RL para inducir la germinación (Fig.2.4.1.1.A.). La Figura 2.4.1.1.B muestra los porcentajes de germinación de semillas Col-0 en función del estímulo lumínico percibido. Los valores de porcentaje de germinación de cada tratamiento lumínico fueron transformados mediante transformación angular para la evaluación estadística. La comparación de medias se realizó mediante una prueba de T ($p < 0.05$).

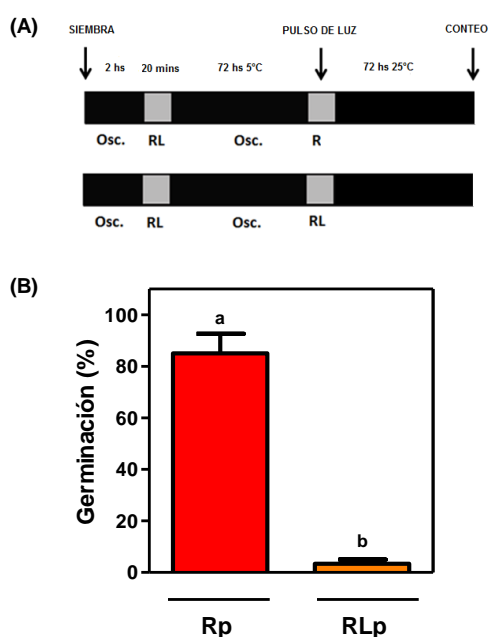


Fig. 2.4.1.1. La germinación es inducida por un pulso de luz roja en semillas de *Arabidopsis thaliana*. (A) Protocolo experimental utilizado para evaluar la promoción de la germinación por luz. (B) Las semillas fueron irradiadas con un Rp o con un RLp. Se evaluó la respuesta a la luz en semillas salvajes Col-0 embebidas en oscuridad durante 3 días a 5°C, previas al pulso de luz R y RL. Cada barra representa la media \pm ES ($n=3$). Las diferencias entre medias se detectaron mediante prueba de T ($p < 0.05$). Osc: oscuridad; RLp: pulso de rojo lejano; Rp: pulso de rojo.

Se observó que la inducción de la germinación por luz R fue de un 85% mientras que no se observaron niveles significativos de germinación en respuesta al RL (valores cercanos al 3%) (Fig.2.4.1.1.B.). Estas semillas fueron utilizadas para evaluar el perfil transcripcional que tiene lugar en respuesta a la inducción de la germinación por acción de la luz. Para ello se llevó a cabo una secuenciación masiva del transcriptoma utilizando la técnica de RNAseq. Se extrajo ARN de semillas del genotipo Col-0 a las 12 horas posteriores al Rp y RLp. Se tomó como criterio de expresión diferencial por luz a los genes con valores de FDR < 0.05 y valores de logFC (*Fold Change*) $\geq |1|$. Los genes que presentan valores de logFC positivos son aquellos cuya expresión es mayor en RL que en R, como fue el caso de *PIL1*, *PIL2* y *ATHB2*, entre otros. A este grupo de genes lo clasificamos como genes DOWN-regulados en R. Los valores de logFC negativos son genes clasificados como UP-regulados en R, como fue el caso de *SPT*, *GA₄* y *PIN7*, entre otros. El total de genes que se expresaron significativa y diferencialmente fue de 5785 genes. De este total de genes, 3099 se encontraron UP-regulados en R y 2686 DOWN-regulados en R (Fig.2.4.1.2.).

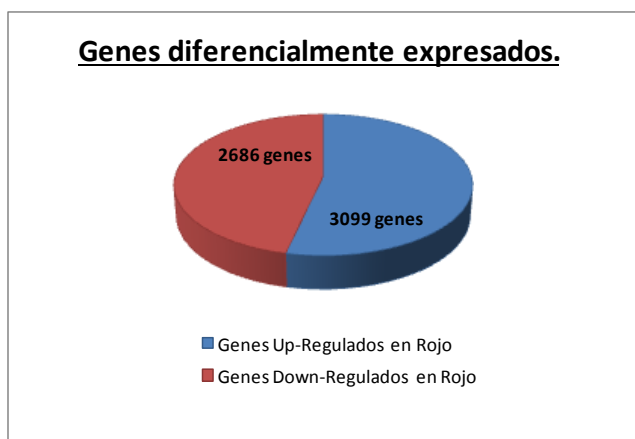


Fig. 2.4.1.2. Genes diferencialmente expresados en respuesta a la luz roja.

El transcriptoma obtenido es de muy buena calidad porque genes de referencia previamente documentados se expresan como están descritos en la literatura (Penfield et al., 2005; Oh et al., 2006, 2007; Kim et al., 2008; Oh et al., 2009; Gabriele et al., 2010; Park et al., 2011; Ibarra et al., 2013). Se categorizó en grupos funcionales basados en *Gene Ontology* (GO) a aquellos genes que estaban diferencialmente expresados por luz R utilizando la herramienta Classification SuperViewer del Bar Toronto. Seleccionamos seis categorías funcionales de nuestro interés y para cada una se determinó un factor de representación (FR). Este factor es el número de genes en común observado dividido el número de genes en común esperado de la superposición de dos grupos independientes de genes. Encontramos enriquecimientos significativos para las categorías sobre-representadas (FR > 1; p < 0.05) correspondientes a respuesta a estímulo, transducción de señales, respuesta a estrés, transcripción, transporte y metabolismo de ADN o ARN (Fig.2.4.1.3.). Vale mencionar que la categoría metabolismo de ADN o ARN exhibió una sub-representación estadísticamente significativa (FR < 1; p < 0,05) en los genes DOWN-regulados. (Fig.2.4.1.3.).

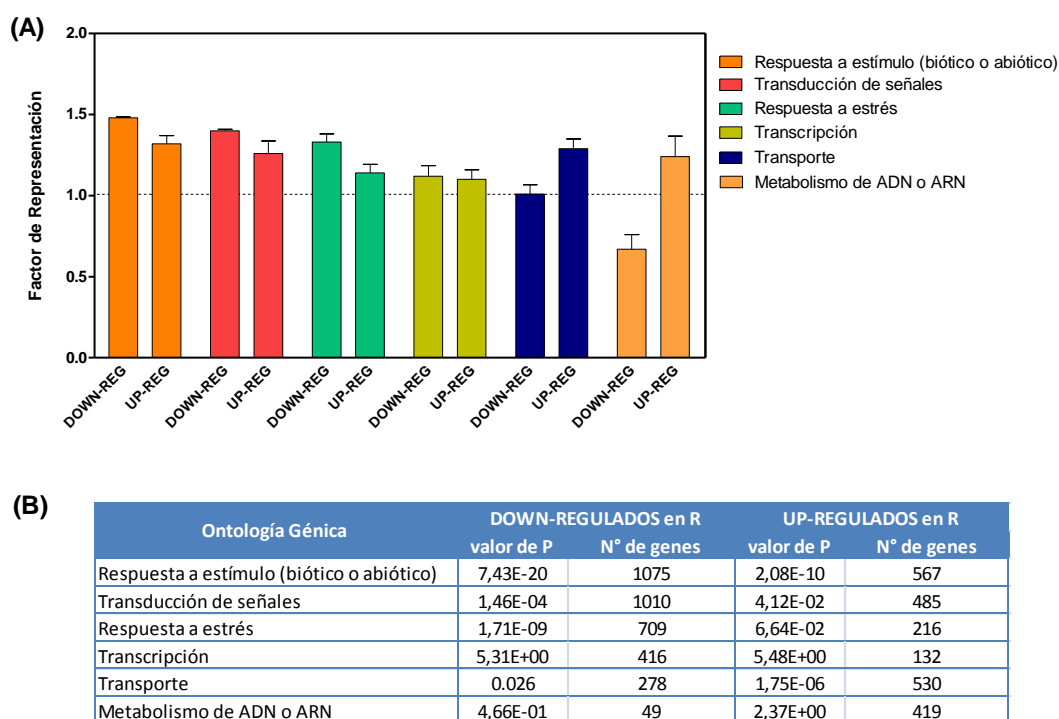


Fig. 2.4.1.3. Clasificación Ontológica. (A) Ontologías génicas de interés sobre-representadas en el transcriptoma asociadas a Procesos Biológicos cuyo factor de representación es superior a 1, en al menos algún set de datos. (B) Número de los genes asociados a las ontologías génicas de (A) con sus respectivos valores de P.

Observamos así mismo cambios en la expresión de un alto número de factores de transcripción, kinasas de proteínas y componentes de la maquinaria de degradación proteica. Entre algunos de ellos podemos mencionar: (a) modificaciones post-traduccionales (*CIPK2*, *CIPK6*, *CIPK12*, *CIPK14*, *CIPK15*, entre otros), (b) degradación proteica (cisteín proteasas, serin proteasas, proteosoma, entre otros), (c) metabolismo hormonal (auxina, ABA, GA, entre otros) y (d) señalización por luz (*PHYA*, *PHYB*, *PHYD*, *PHYE*, *PHOT1*, *PIF6/PIL2*, entre otros).

Un alto número de genes vinculados al metabolismo del ARN también se vieron enriquecidos en nuestro transcriptoma. Entre algunos de dichos genes encontramos (a) componentes del *spliceosoma* (*U2AF35A*, *U2AF35B*, *U2AF65*, entre otros) y (b) genes que codifican proteínas del tipo SR, una familia conservada de reguladores de *splicing* (*RSP31*, *SR33*, *SRP40*, entre otros). Estos genes serán descritos en las secciones siguientes de este capítulo.

2.4.2. Clasificación de los genes diferencialmente *spliceados* por luz.

Con el objetivo de identificar y estudiar genes y variantes de SA que se expresan en semillas inducidas a germinar por luz, utilizamos la base de datos del transcriptoma (comentada en la sección previa) definiendo como criterio de selección de genes diferencialmente *spliceados* a aquellos con valores de $FDR < 0.15$ y luego filtramos por una diferencia de PIR (para intrones) o PSI (para exones) entre tratamientos con valor absoluto mayores a 0.1 (10%) y menores a 0.95 (95%). Identificamos un total de 226 genes que presentan cambios a nivel de *splicing* alternativo entre los tratamientos de luz R y RL. Con el fin de evaluar el rol regulatorio del SA durante la germinación de semillas por luz, se comparó la proporción de esos genes que también fueron regulados significativamente en el transcriptoma de expresión global (allí habíamos identificado un total de 5785 genes diferencialmente expresados por luz R). El 54.87% de los 226 genes que presentan SA (124) no son regulados en su expresión total mientras que el 45.13% de los genes (102) sí aparecen significativamente expresados por luz R en el transcriptoma de expresión génica (Fig.2.4.2.1.A.). De esos 102 genes que se vieron afectados por luz R a nivel de expresión génica como así también a nivel de SA, 32 genes fueron UP-regulados y 70 genes fueron DOWN-regulados. Estos resultados sugieren que el *splicing* alternativo es una forma de control transcripcional independiente, al menos en parte, de la regulación de la expresión génica durante la germinación de las semillas en *Arabidopsis thaliana*.

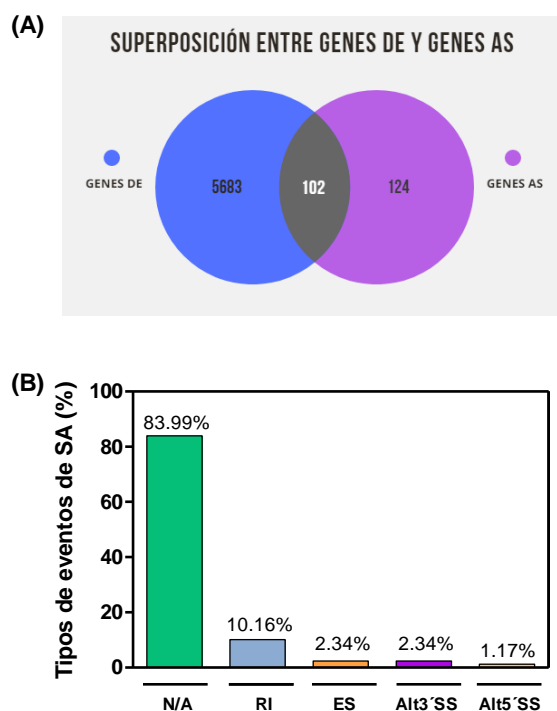


Fig. 2.4.2.1. Patrones cuantitativos de expresión de SA y de expresión génica en semillas de *Arabidopsis thaliana* inducidas a germinar por luz R. (A) El esquema representa la superposición entre genes diferencialmente afectados por luz R a nivel de expresión génica (5785 genes) y genes regulados por luz R a nivel de *splicing* alternativo (226 genes). (B) El gráfico representa los porcentajes de eventos de *splicing* alternativo en función del tipo de evento asociado. N/A: eventos no anotados en el TAIR10, RI: retención de intrón, ES: salteado exónico, Alt3'SS: sitios 3'alternativos de *splicing*, Alt5'SS: sitios 5'alternativos de *splicing*. Genes DE: genes diferencialmente expresados; genes AS: genes alternativamente *spliceados*.

Procedimos luego a realizar una clasificación de los datos obtenidos según el tipo de evento de *splicing* (Fig.2.4.2.1.B.). De los 226 genes que presentan *splicing* alternativo, el 84% de los eventos modulados por luz R son eventos no anotados (N/A) y por lo tanto no han sido documentados previamente. Del 16% restante de los genes cuyos eventos de *splicing* sí están anotados: el 10.16% de los genes pertenecen al tipo retención de intrón (RI), el 4.68% de los genes pertenecen a las categorías salteado exónico (ES) y sitios 3'alternativos de *splicing* (Alt3'SS), y el 1.17% de los genes son del tipo 5'alternativos de *splicing* (Alt5'SS) (Fig.2.4.2.1.B.).

2.4.3. Clasificación Ontológica de los genes que presentan *splicing* alternativo inducido por luz.

Para clasificar la funcionalidad de los 226 genes que presentan *splicing* alternativo, se realizó un análisis de ontología génica utilizando la herramienta BioMaps del

software VirtualPlant 1.3 (Katari et al., 2010). Se utilizó el Test de Fisher como método para calcular el valor de P de las categorías sobre-representadas, utilizando como valor de corte $p \leq 0.01$. En el grupo de los genes diferencialmente afectados por luz R a nivel de expresión génica (DE), se observó un enriquecimiento en las categorías de GO asociadas a respuesta a estímulo por luz, respuesta a estímulo por ABA y respuesta a temperatura (Fig.2.4.3.1. y Anexo Tabla 2.4.3.1.). Por otra parte, en el grupo de los genes regulados por luz R a nivel de SA, se observó un enriquecimiento en las categorías de GO asociadas al *splicing* del ARN, procesamiento del ARNm y procesos metabólicos del ARNm. En estas categorías sobre-representadas aparecen genes cuyos patrones de SA son afectados por luz pero no diferencialmente expresados en el transcriptoma global de expresión (124 genes) (Fig.2.4.3.1. y Anexo Tabla 2.4.3.1.). Entre los genes regulados por luz R a nivel de *splicing* alternativo encontramos algunos genes que codifican proteínas ricas en arginina y serina (SR), como *SR34a* (AT3G49430), *RS41* (AT5G52040) y *RS31* (AT3G61860). Estos datos sugieren que la germinación inducida por luz R promueve la expresión de genes relacionados al metabolismo del ARN y a factores de *splicing* que regulan la maquinaria de SA. Los resultados de estos experimentos demuestran que la luz R regula los patrones de *splicing* alternativo en las semillas inducidas a germinar, mayoritariamente a través de su efecto sobre el *splicing* alternativo de los factores de *splicing* en sí.

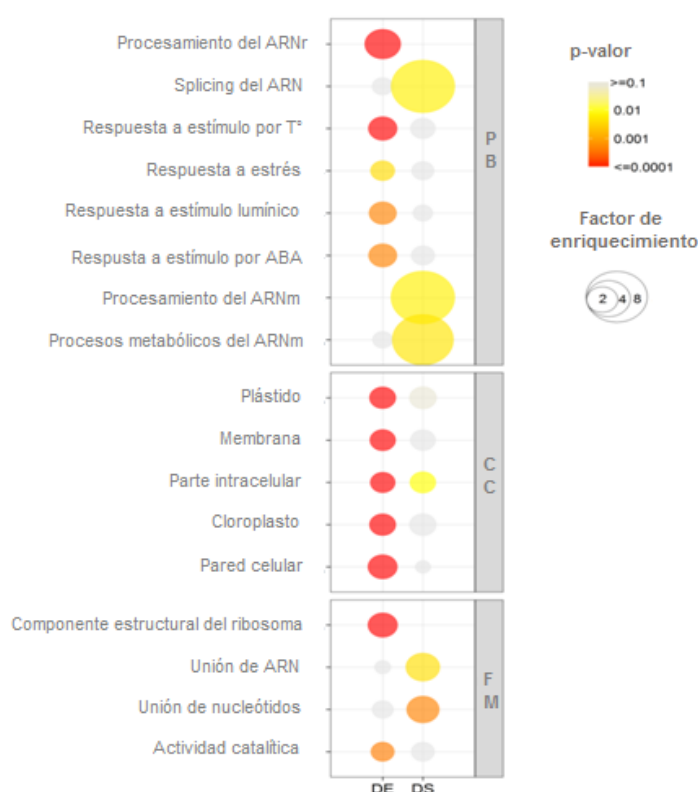


Fig. 2.4.3.1. Análisis de enriquecimiento de las GO. La figura compara las ontologías entre los genes diferencialmente afectados por luz R a nivel de expresión génica (DE) y los genes regulados por luz R a nivel de *splicing* alternativo (DS). El enriquecimiento por GO fue evaluado en tres niveles diferentes: procesos biológicos (PB), componente celular (CC) y función molecular (FM). El gradiente de colores representa los valores de P ajustados y el tamaño de los círculos representa el factor de enriquecimiento. Se representan sólo las categorías que muestran un enriquecimiento estadísticamente significativo en al menos un set de datos (DE o DS). El gráfico ha sido creado con un script personalizado en el programa estadístico R (realizado con la colaboración de María Teresa Saura-Sánchez). DE: diferencialmente expresado; DS: diferencialmente *spliceado*.

2.4.4. Meta-análisis entre eventos de *splicing* alternativo inducidos por luz y transcriptomas asociados a otros procesos fisiológicos.

Decidimos realizar una comparación de diferentes transcriptomas con el objetivo de evaluar si existen eventos de *splicing* alternativo conservados en distintos procesos fisiológicos que ocurren en las semillas y plántulas. Para ello seleccionamos dos transcriptomas recientemente publicados: (a) Srinivasan et al. 2016, en el que evalúan el SA en semillas en desarrollo durante la etapa final de la maduración entre los 14 y 20 días posteriores a la polinización, y (b) Hartmann et al. 2016, en el que evalúan el SA en plántulas etioladas crecidas en oscuridad y expuestas a seis horas de luz blanca. La Tabla 2.4.4.1. resume la clasificación por tipo de evento de *splicing* alternativo para cada uno de los transcriptomas evaluados. En el caso de nuestro transcriptoma, usamos

el criterio de sólo comparar los eventos anotados (41 eventos totales), y en base a ello re-calculamos los porcentajes para cada tipo de evento.

Tipo de Evento	Tognacca et al. (Datos de esta tesis)	Srinivasan et al. (2016)	Hartmann et al. (2016)
RI	63.41%	69,27%	36,38%
ES	14.64%	1,33%	18,92%
Alt3'SS	14.64%	11,33%	26,61%
Alt5'SS	7.31%	11,33%	18,09%
N° Total de eventos	41	1809	481

Tabla 2.4.4.1. Distintos procesos fisiológicos comparten parcialmente eventos de *splicing* alternativo. La tabla representa los porcentajes de eventos de *splicing* alternativo en función del tipo de evento asociado. RI: retención de intrón, ES: salteado exónico, Alt3'SS: sitios aceptores de *splicing*, Alt5'SS: sitios dadores de *splicing*.

Srinivasan et al. (2016), utilizando semillas Col-0 en desarrollo 14 o 20 días posteriores a la polinización, encontraron un total de 8567 eventos en 4723 genes a los 14 días y 8250 eventos en 4494 genes a los 20 días. De ellos, un total de 1809 eventos de SA en 1408 genes se expresaron diferencialmente durante la maduración de las semillas (14 vs 20 días de maduración), los cuales representan un 20% de los genes que son alternativamente *spliceados*. El tipo de evento más común fue el de retención de intrón, representando un 69,27% del total de eventos de SA. La metodología experimental utilizada en este trabajo para evaluar los eventos de *splicing* alternativo difiere a los usados en mi tesis debido a que utilizaron criterios de clasificación diferentes (FDR del 5% y $q \leq 0.05$). El trabajo de Hartmann et al. analizó el transcriptoma de plántulas etioladas crecidas en oscuridad durante 6 días y luego expuestas a luz blanca. El transcriptoma arrojó un total de 481 eventos de SA significativamente alterados en 213 genes (FDR < 0.1). El tipo de evento más común encontrado en su transcriptoma fue el de retención de intrón, representando un 36,38% del total de eventos de SA (Hartmann et al., 2016).

El próximo paso fue analizar cuántos y cuáles genes que presentan SA (226, 213 y 1408 genes en Tognacca, Hartmann et al. y Srinivasan et al., respectivamente) son comunes a todos los transcriptomas evaluados, utilizando el software Venny^{2.1} (Oliveros, 2007-2015) para realizar la comparación de los listados de genes. La Figura 2.4.4.1. muestra el número de genes en común presente en los tres transcriptomas evaluados. Se observó que los procesos de maduración de las semillas (Srinivasan et al., 2016) y la inducción de la germinación por luz de las semillas (datos de esta tesis) comparten la expresión diferencial de 34 genes regulados a nivel de *splicing* alternativo. Entre algunos de estos genes encontramos a *SR34b*, un regulador de *splicing*. Entre los procesos de germinación por luz mostrados en esta tesis y la de-etiolación de la plántula (Hartmann et al., 2016), encontramos un grupo de 17 genes comunes regulados a nivel de *splicing* alternativo. Entre algunos de estos genes encontramos a (a) *GRP7*: un gen que codifica una pequeña proteína de unión a ARN rica en glicina que forma parte de un circuito de retroalimentación negativa a través de la cual *GRP7* regula las oscilaciones

circadianas de su propia transcripción y (b) proteínas del tipo SR, como *SR34a* y *RS31* (Fig.2.4.4.1.). Al comparar lo que sucede con la regulación del *splicing* alternativo en los tres procesos fisiológicos, encontramos 15 genes comunes. Entre estos genes encontramos algunos miembros de la familia de proteínas del tipo SR como *SR30* y *RS41* (Fig.2.4.4.1. y Tabla 2.4.4.2.).

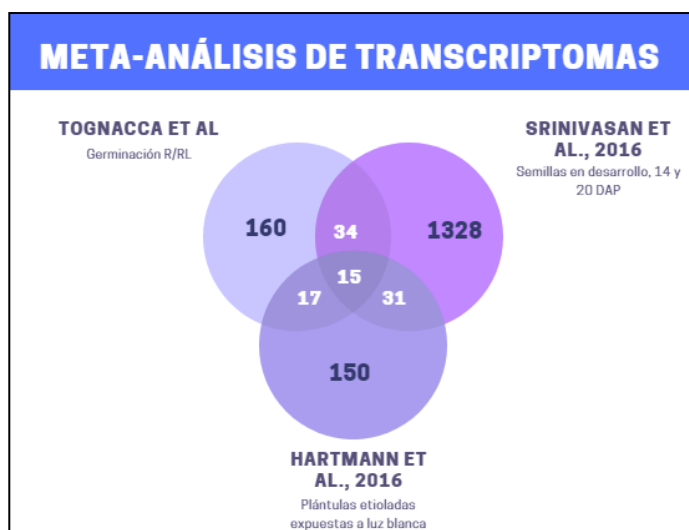


Fig. 2.4.4.1. Eventos de *splicing* alternativo conservados durante distintas etapas del desarrollo de las plantas. La figura compara el número de genes en común entre los genes regulados a nivel de *splicing* alternativo en los tres transcriptomas que se mencionan. *Nota: los datos del transcriptoma de esta tesis (Tognacca et al.) aún se encuentran en preparación para ser publicados.*

ATG	NOMBRE	ANOTACIÓN
At1g09140	SR30	SERINE-ARGININE PROTEIN 30
At1g28330	DRM1	dormancy-associated protein-like 1
At1g30970	SUF4	zinc finger (C2H2 type) family protein
At1g63690	SPPL2	SIGNAL PEPTIDE PEPTIDASE-LIKE 2
At1g70620		cyclin-related
At2g02570		nucleic acid binding;RNA binding
At3g01100	HYP1	hypothetical protein 1
At3g06550	RWA2	O-acetyltransferase family protein
At3g15351		P53/DNA damage-regulated protein
At3g47680		DNA binding
At3g57300	INO80	Encodes the Arabidopsis INO80 ortholog of the SWI/SNF ATPase
At4g39260	GRP8	cold, circadian rhythm, and RNA binding 1
At5g07370	IPK2A	inositol polyphosphate kinase 2 alpha
At5g10350		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
At5g52040	RSP41	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein

Tabla 2.4.4.2. Genes comunes compartidos en distintos procesos fisiológicos. La tabla muestra los 15 genes que sufren modificaciones a nivel de *splicing* alternativo en los tres transcriptomas evaluados.

Con el objeto de clasificar la funcionalidad de los genes que presentan *splicing* alternativo en los tres transcriptomas, realizamos un análisis de ontología génica utilizando la herramienta BioMaps del software VirtualPlant 1.3 (Katari et al., 2010). Se utilizó el Test de Fisher como método para calcular el valor de P de las categorías sobre-representadas, utilizando como valor de corte $p \leq 0.01$. Se observó un enriquecimiento en las categorías de GO asociadas al *splicing* del ARN, procesamiento del ARNm y procesos metabólicos del ARNm (Fig.2.4.4.2.). Estos datos están en concordancia con observaciones previas en las que se demostró que los genes relacionados al metabolismo del ARN son los más afectados por el SA (Syed et al., 2012b; Reddy et al., 2013). Los resultados de estos análisis demuestran que durante distintas etapas del desarrollo de una planta existe una conservación de genes que sufren modificaciones a nivel de *splicing* alternativo, mayoritariamente a través de su efecto sobre el *splicing* alternativo de los factores de *splicing* en sí.

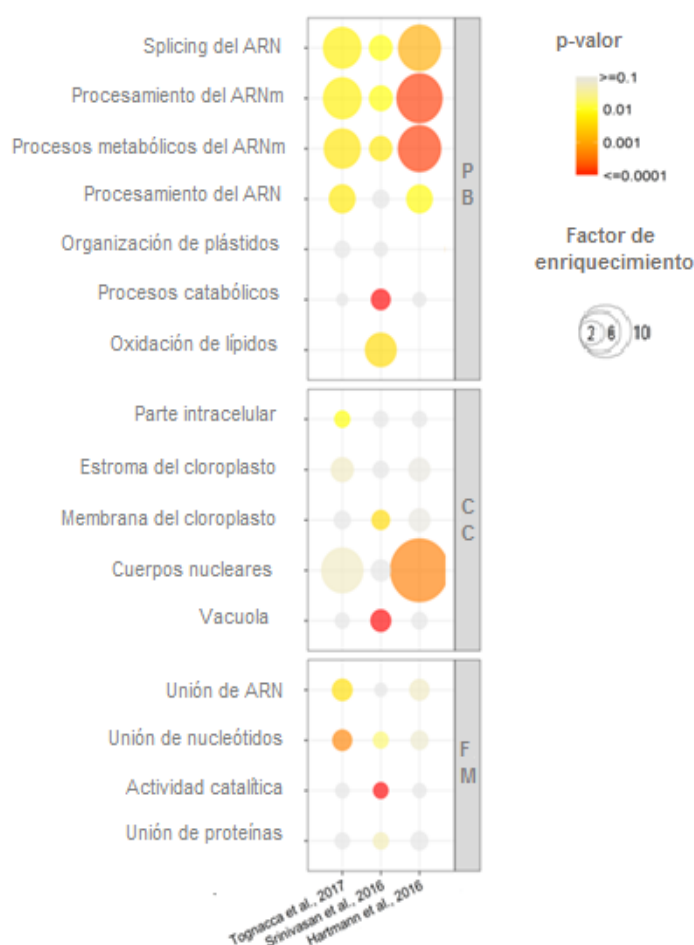


Fig. 2.4.4.2. Eventos de *splicing* alternativo entre semillas en desarrollo, semillas embebidas y plántulas. La figura compara las ontologías entre los genes regulados a nivel de *splicing* alternativo en los tres transcriptomas. El enriquecimiento por GO fue evaluado en tres niveles diferentes: procesos biológicos (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF). El gradiente de colores representa los p-valores ajustados y el tamaño de los círculos representa el factor de enriquecimiento. Se representan sólo las categorías que muestran un enriquecimiento estadísticamente significativo en al menos un set de datos. El gráfico ha sido creado con un script personalizado en el programa estadístico R (realizado con la colaboración de María Teresa Saura-Sánchez).

2.4.5. Validación de algunos eventos de *splicing* alternativo mediante PCR semi-cuantitativa en semillas salvajes Col-0 de *Arabidopsis thaliana*.

La siguiente aproximación experimental fue la de validar algunos de los genes que salieron como significativos en nuestro transcriptoma de *splicing* alternativo. Para ello utilizamos como material de partida las mismas muestras de ARN de las semillas Col-0 usadas para realizar el RNAseq. A partir de este ARN se sintetizó el ADN copia mediante transcripción reversa, el cual fue utilizado para realizar las PCRs semi-

cuantitativas correspondientes para cada gen a evaluar. Los productos amplificados de la PCR se separaron mediante una corrida en un gel de poliacrilamida. De esta manera se pueden observar las bandas correspondientes a los diferentes productos de PCR que son generados por la amplificación del ADN copia de las diferentes isoformas. Los productos se cuantificaron utilizando el software ImageJ. Con dichos datos de densitometría se calcularon los índices de *splicing* como el cociente entre la abundancia de la isoforma más larga relativa a los niveles de todas las isoformas posibles totales, para cada gen evaluado siguiéndose protocolos establecidos en Petrillo et al. (2014).

Para la validación experimental seleccionamos un total de 4 genes en base a dos criterios simultáneos: (a) genes involucrados en el proceso de *splicing* del ARN y (b) genes previamente documentados en la literatura (Petrillo et al., 2014; Shikata et al., 2014). Se seleccionaron *U2AF65* (un factor auxiliar de *splicing*) y tres genes del tipo SR que participan en el proceso de *splicing*: *SR30*, *RS31* y *RS31a*. La Figura 2.4.5.1. muestra el índice de *splicing* para los tratamientos de luz que recibieron las semillas Col-0. Se observó que el índice de *splicing* de todos los genes evaluados disminuyó entre 5 a 2 veces en respuesta al Rp con respecto al tratamiento control de luz RL. Los resultados de estos experimentos confirman que el patrón de *splicing* alternativo de los genes *U2AF65*, *SR30*, *RS31* y *RS31a* está bajo regulación de la luz R en semillas embebidas de Arabidopsis.

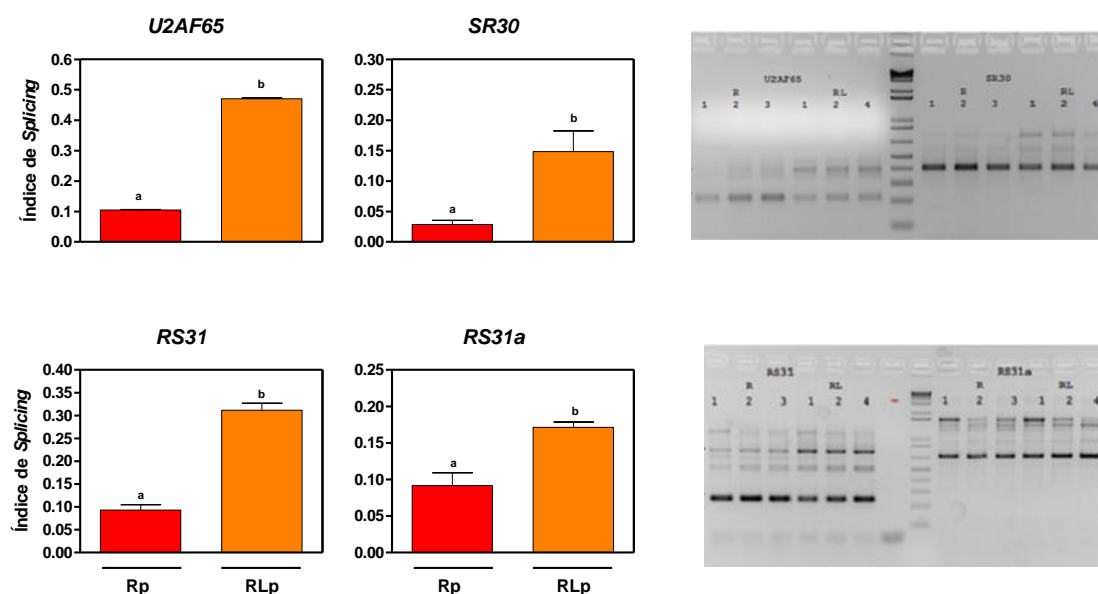


Fig. 2.4.5.1. Validación de genes que presentan *splicing* alternativo mediado por luz. Validación por PCR semi-cuantitativa de eventos de *splicing* inducidos por luz en semillas Col-0. Se muestra la relación entre las isoformas de cada gen en función del estímulo lumínico percibido por las semillas. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de un factor ($p < 0.05$). Se adjuntan los geles correspondientes a los genes evaluados. Rp: pulso de rojo; RLp: pulso de rojo lejano. (Datos obtenidos con la colaboración de Lucas Servi & Ezequiel Petrillo).

2.4.6. Rol de los fitocromos en el patrón de *splicing* alternativo en semillas embebidas de *Arabidopsis*.

La inducción de la germinación por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana* es mediada exclusivamente por los fitocromos. El genoma de *Arabidopsis* codifica para 5 fitocromos distintos con funciones diferentes en la promoción de la germinación por luz (Botto et al., 1995; Shinomura et al., 1996; Henning et al., 2002; Arana et al., 2014). El phyA y el phyB son los fotorreceptores principales que promueven la germinación (Botto et al., 1995; Shinomura et al., 1996). En esta tesis evaluamos la contribución de estos fotorreceptores en la expresión de los patrones de SA. Para ello, diseñamos un nuevo experimento utilizando semillas salvajes y mutantes *phyB* y *phyA phyB*. Inicialmente evaluamos la germinación de semillas salvajes y mutantes estratificadas durante 3 días a 5°C e irradiadas con un Rp o RLp. Se observó que el Rp indujo la germinación de semillas Col-0 en un 98%, mientras que las mutantes *phyB* germinaron un 10%. En semillas dobles mutante *phyA phyB* se observó una promoción parcial de la germinación por luz R de aproximadamente 40%, sugiriendo que otros fitocromos promueven la germinación por luz en ausencia de phyA y phyB. La luz RL no indujo niveles significativos de germinación en ninguno de los genotipos evaluados (Fig.2.4.6.1.). En todos los casos, la germinación en luz RL fue menor al 20%. Estos resultados sugieren que el phyB es el principal fitocromo que induce la germinación en nuestras condiciones experimentales.

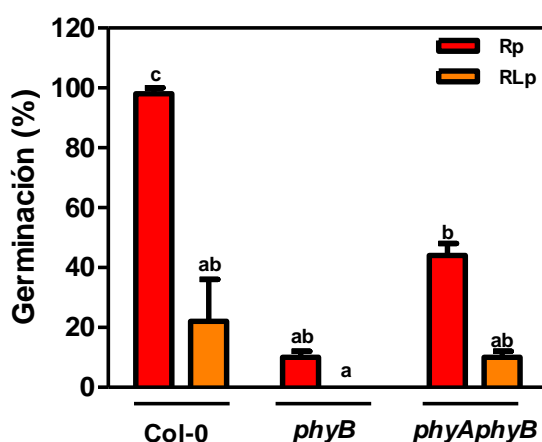


Fig. 2.4.6.1. La luz R promueve la germinación de semillas Col-0. Germinación de semillas Col-0 y mutantes de fitocromos embebidas durante 3 días en oscuridad a 5°C, previas Rp o RLp. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher ($p < 0.05$). Rp: pulso de luz rojo; RLp: pulso de luz rojo lejano.

Con las semillas de estos materiales procedimos a realizar las extracciones de ARN y posterior síntesis del ADN copia para evaluar, mediante PCR semi-cuantitativa, los patrones de *splicing* alternativo. La Fig.2.4.6.2. muestra los geles correspondientes a los genes *PIF6*, *ABI3*, *DRM1*, *U2AF65*, *RS31*, *RS31a* y *SR30* tanto en semillas del genotipo salvaje como en las mutantes *phyB* y *phyA phyB*. Para los genes *PIF6* y *ABI3* no se detectaron diferencias ni por genotipo ni por luz en los geles. Estos datos no se cuantificaron ya que, adicionalmente, no se pudieron detectar todas las isoformas presentes, por lo que se descartaron de los análisis posteriores.

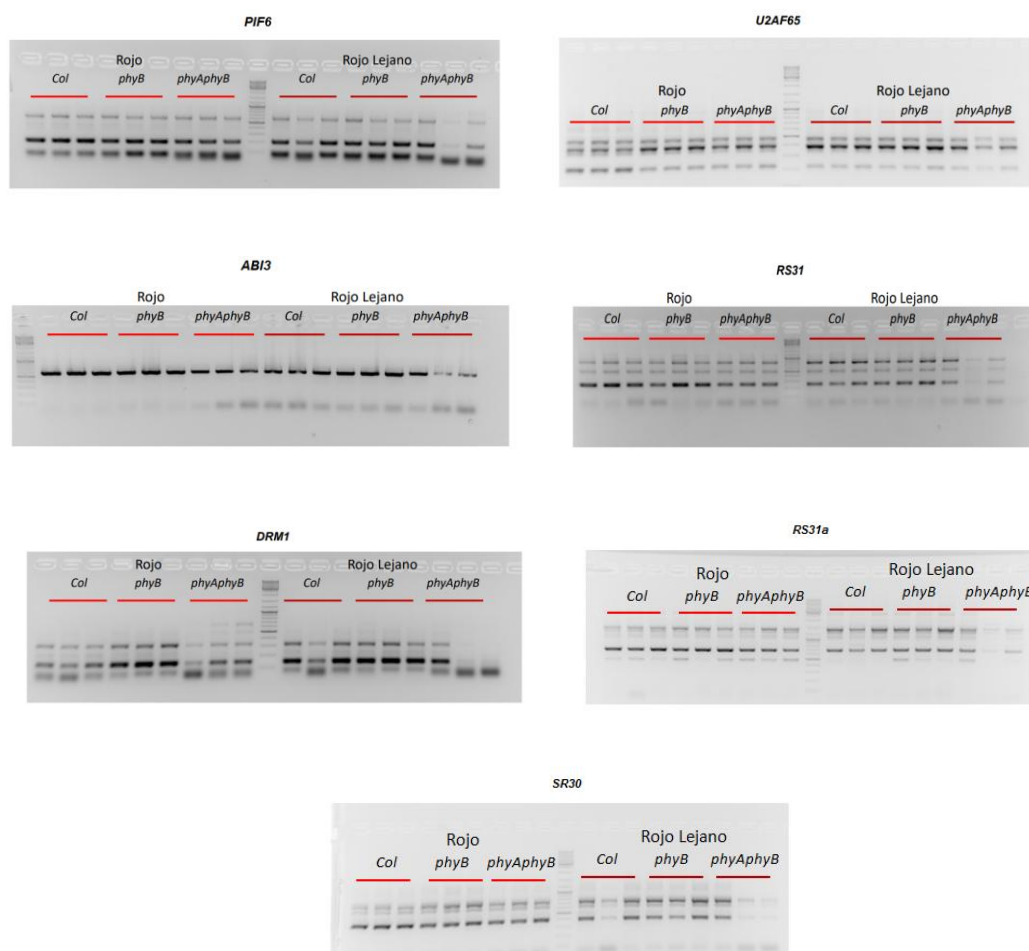


Fig. 2.4.6.2. Rol de los fitocromos sobre el SA de algunos genes. Medición por PCR semi-cuantitativa de eventos de *splicing* inducidos por luz en semillas Col-0 y mutantes *phyB* y *phyAphyB*. Se muestran las fotos de los geles de 7 genes evaluados. (Datos obtenidos con la colaboración de Lucas Servi & Ezequiel Petrillo).

Procedimos luego a cuantificar los datos de las PCRs para calcular los valores de índice de *splicing* de los genes restantes. El gen *DRM1* no mostró diferencias significativas ni por genotipo ni por luz (Fig.2.4.6.3.). Para el gen *U2AF65*, la luz R redujo significativamente el índice de *splicing* un 40%. En las semillas mutantes *phyB* y *phyAphyB* el índice de *splicing* también se redujo significativamente en luz R, aunque en menor proporción que el genotipo salvaje. Estos resultados sugieren que el *phyB* está involucrado en la vía de señalización lumínica que altera la abundancia relativa de las isoformas de *U2AF65* (Fig.2.4.6.3.).

En el caso de los genes *RS31*, *RS31a* y *SR30* se observó que la luz R redujo significativamente el índice de *splicing*. En semillas salvajes, la luz R redujo el índice de *splicing* entre un 60% a 70%. Las semillas mutantes *phyB* y *phyAphyB* mostraron igual índice de *splicing* que el genotipo salvaje cuando fueron expuestas a luz RL. La ausencia de *phyA* y *phyB* alteró los índices de *splicing* de distinta manera según el gen considerado. Para el gen *RS31*, la expresión de las distintas isoformas no sufrió grandes variaciones en las semillas doble mutante *phyAphyB* con respecto a las semillas salvajes. Sin embargo, para el gen *RS31a*, la luz R redujo el índice de *splicing* en menor proporción en semillas doble mutante *phyAphyB* con respecto al genotipo salvaje y *phyB*, sugiriendo una regulación parcial del *phyA* en los cambios en la expresión de las distintas isoformas. En oposición, la luz R redujo significativamente y en menor proporción las isoformas del gen *SR30* en semillas *phyB* con respecto al genotipo salvaje y al doble mutante *phyAphyB*, sugiriendo una acción parcial del *phyB* en los cambios en la expresión de las distintas isoformas (Fig.2.4.6.3.).

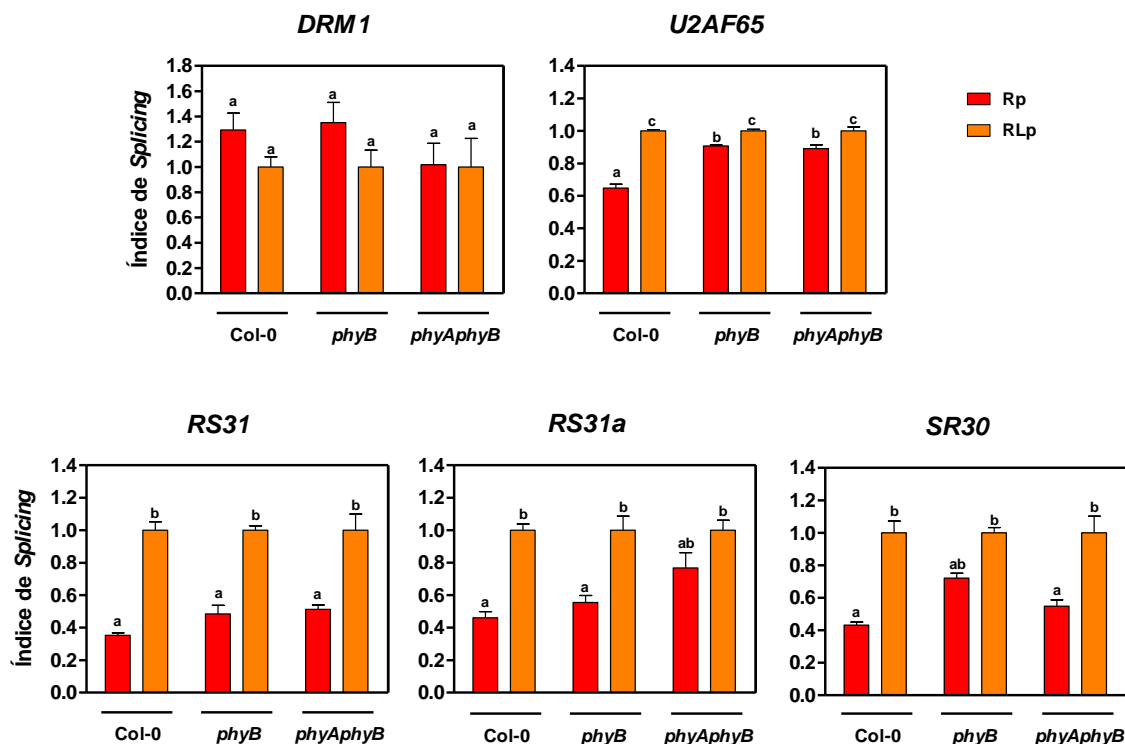


Fig. 2.4.6.3. Rol de los fitocromos en la vía de señalización lumínica que altera la abundancia relativa de isoformas de algunos genes. Medición por PCR semi-cuantitativa de eventos de *splicing* inducidos por luz en semillas *Col-0* y mutantes *phyB* y *phyAphyB*. Se muestra la relación entre las isoformas de cada gen en función del estímulo lumínico percibido por las semillas. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (p<0.05). Rp: pulso de rojo; RLp: pulso de rojo lejano. Los datos se relativizaron al valor promedio en luz RL. (Datos obtenidos con la colaboración de Lucas Servi & Ezequiel Petrillo).

2.4.7. Sensibilidad a la luz en semillas que sobre-expresan el gen *RS31*.

Los resultados del transcriptoma muestran que un grupo importante de genes están bajo regulación de la luz R en las semillas (por ejemplo, *U2AF65*, *RS31*, *RS31a*, *SR30*), sin embargo sólo detectamos cambios sutiles en los índices de *splicing* entre semillas salvajes, mutantes de *phyB* y *phyAphyB* para tres de esos genes (*RS31*, *RS31a* y *SR30*). Para corroborar estos resultados, decidimos evaluar la germinación de semillas sobre-expresantes del gen *RS31* previamente publicado (Petrillo et al., 2014) en distintas condiciones de luz que establecen distintos fotoequilibrios de Pfr/P ($P=Pfr+Pr$) en las semillas. La respuesta al Pfr/P en semillas de *Arabidopsis* esta principalmente mediada por el phyA a bajos fotoequilibrios (hasta 30% de Pfr/P, dependiendo de la sensibilidad a la luz de las semillas) y por el phyB a fotoequilibrios mayores (Botto et al., 1995,

1996; Arana et al., 2014). Las semillas fueron incubadas durante 3 días a 5°C para disminuir los niveles de dormición y homogenizar la germinación y luego recibieron distintos tratamientos de luz que establecen distintos fotoequilibrios de Pfr/P, manteniéndose un control en total oscuridad. La Figura 2.4.7.1.A. muestra los porcentajes de germinación de las semillas en función al fotoequilibrio Pfr/P (%) establecido. Podemos observar que las semillas salvajes Col-0 muestran una curva bifásica de germinación al fotoequilibrio. La primera fase se extiende de la oscuridad hasta Pfr/P=10% donde las semillas salvajes germinan 60%. La segunda fase comienza en Pfr/P=33% y alcanza valores máximos de germinación del 98% cuando el Pfr/P=87. Estas dos fases de germinación están separadas entre sí por un *plateau* donde no se observan cambios en los porcentajes de germinación a pesar que el fotoequilibrio varía entre 10 a 33%. Según evidencias previas trabajando con mutantes de fitocromos de *Arabidopsis thaliana*, el phyA mediaría la respuesta hasta el Pfr/P=10% y el phyB es el fitocromo principal que media la respuesta entre Pfr/P=33-87% (Botto et al., 1995, 1996, Arana et al., 2014). Es interesante haber notado que las semillas transgénicas RS31-OX (sobre-expresan al gen *RS31* bajo el promotor constitutivo 35S) tuvieron niveles de germinación despreciables en oscuridad y no respondieron a fotoequilibrios bajos menores a 61%. Sin embargo, las semillas RS31-OX germinaron por encima del 80% cuando fueron expuestas a Pfr/P=61 y 87%. Estos resultados demuestran claramente que la sobre-expresión del gen *RS31* disminuye la sensibilidad de las semillas a la luz mediada por los fitocromos a pesar que el uso de materiales mutantes de *phyB* y *phyAphyB* no nos permitieron identificar cambios en la expresión de las distintas isoformas de este gen. Nuevos experimentos deben ser diseñados para indagar sobre los mecanismos de acción de este gen de *splicing* en la red de señales moleculares de los fitocromos.

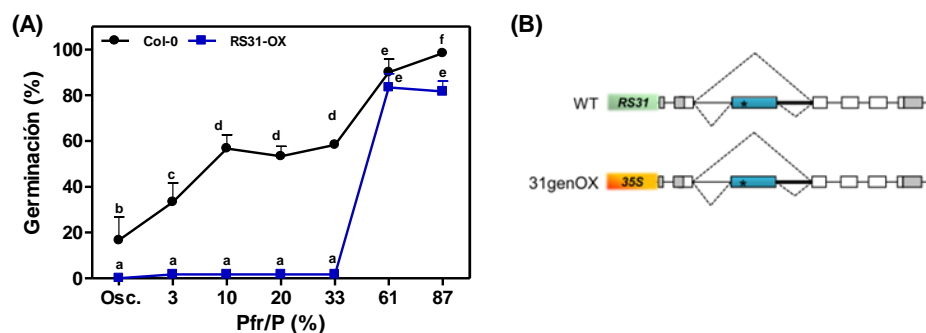


Fig. 2.4.7.1. La sobre-expresión de *RS31* modifica la sensibilidad de las semillas a la luz. (A) Germinación de semillas Col-0 y sobre-expresantes de *RS31* embebidas en oscuridad durante 3 días a 5°C, previas al estímulo lumínico. Cada punto representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias (p<0.05). Pfr/P: relación entre la forma activa de los fitocromos y la cantidad total de cromoproteína (Pfr+Pr). (B) Esquema de la construcción de la línea sobre-expresante RS31-OX utilizada (modificada de Petrillo et al., 2014). Osc.: oscuridad.

2.5. DISCUSIÓN.

El análisis global de expresión que tiene lugar durante la germinación inducida por luz R es mediada por el Pfr de phyB a través de la acción de PIF1/PIL5 (Oh et al., 2009). Se ha demostrado además que HFR1, un regulador positivo de la germinación dependiente de phyB, bloquea la actividad transcripcional de *PIF1/PIL5* formando heterodímeros e impidiendo su unión al ADN (Shi et al., 2013). En esta tesis realizamos una secuenciación masiva del transcriptoma de semillas Col-0 que fueron inducidas a germinar por un Rp o RLp, mediante la técnica de RNAseq y analizamos los resultados obtenidos evaluando cambios a nivel de expresión génica ($FDR \leq 0.05$). Los datos transcriptómicos obtenidos demuestran que la luz R altera la expresión del ~20% del genoma de *Arabidopsis* en semillas Col-0 embebidas (5785 genes; Fig.2.4.1.2.). La imbibición de las semillas activa numerosos procesos biológicos que incluyen reparaciones del ADN, membranas y reparaciones mitocondriales y requiere además de la síntesis de proteínas. Cuando las semillas embebidas son expuestas a la luz, estos procesos celulares se intensifican para iniciar la elongación del eje embrionario que promueve la extrusión de la radícula. La germinación de las semillas se ve acompañada por modificaciones drásticas en las propiedades de la pared celular, dado que las células embrionarias se alargan a través de la capa endotelial y la testa. Se ha demostrado que el transcriptoma mediado por phyA y phyB modula las propiedades de la pared celular activando la expresión de los genes de expansinas y xiloglucanos (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013). La luz, a través del módulo HFR1-PIF1/PIL5, participa en el control de la expresión de estas enzimas asociadas al ablandamiento de la pared celular (Shi et al., 2013). En esta tesis demostramos que la luz R estimula la expresión de estas familias de genes (*EXP2*, *EXP3*, *EXP9*, *EXP10*, *XTH9*, *XTH17*, *XTH18*, *XTH22*, *XTH33*, entre otros) junto con genes de síntesis de celulosa y hemicelulosa (*CSLE1*, *CSLC4*, *CSLC6*, *CSLC8*, *CESA5*, *IRX14*, entre otros), confirmando que el control de la germinación inducida por luz R involucra el control de la actividad de enzimas de pared (Fig.2.4.1.3.).

Si bien el conocimiento que tenemos acerca del transcriptoma promovido por luz en semillas de *Arabidopsis* es bastante completo (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013), aún desconocemos la importancia del *splicing* alternativo en la promoción de la germinación por luz en semillas. En esta tesis, analizamos los resultados obtenidos de la secuenciación del transcriptoma evaluando cambios a nivel de nivel de *splicing* alternativo usando un criterio de selección exigente para evitar tener falsos positivos ($FDR < 0.15$). Nuestros datos arrojaron un total de 226 genes diferencialmente afectados por luz R a nivel de *splicing* alternativo. El 45% de dichos genes también fueron modulados a nivel de ARNm total, sugiriendo que la luz modula a través de mecanismo/s diferente/s la regulación del SA o de la expresión génica (Fig.2.4.2.1.A.). De nuestros 226 genes, la retención de intrón fue el tipo de evento mayoritario (Fig.2.4.2.1.B.), como ya ha sido documentado en otras especies como arroz, sorgo, maíz, soja e incluso *Arabidopsis* (Marquez et al., 2012; Shen et al., 2014; Thatcher et al., 2014; Min et al., 2015). Encontramos un enriquecimiento de genes pertenecientes a categorías funcionales como *splicing* del ARN, procesamiento del ARNm y procesos metabólicos del ARN (Fig.2.4.3.1. y Anexo Tabla 2.4.3.1.). Estos datos concuerdan con estudios previos que demuestran la existencia de la regulación del SA de los pre-ARN en varios factores de *splicing* (Reddy & Shad Ali, 2011; Syed et al., 2012; Wachter et

al., 2012; Reddy et al., 2013; Staiger & Brown, 2013; Shikata et al., 2014; Mancini et al., 2016). Los resultados de estos análisis demuestran que la germinación inducida por luz R tiene efectos significativos sobre el SA de genes que codifican factores de *splicing* y también de genes asociados con los procesos de dormición y germinación de las semillas (Fig.2.4.3.1. y Fig.2.4.6.2.).

Entre algunos de los factores de *splicing* encontramos genes que codifican proteínas del tipo SR, una familia conservada de reguladores de *splicing*. Por otra parte, encontramos además que existen genes de la maquinaria de *splicing* alternativo cuyos niveles de SA afectados por luz o por el estadio del desarrollo de la semilla se conservan durante diferentes etapas del desarrollo, que van desde la maduración de las semillas hasta la fotomorfogénesis de las plántulas (Fig.2.4.4.1., Fig.2.4.4.2. y Tabla 2.4.4.2.), lo cual apoya la idea de que el SA es un proceso fisiológico de relevancia. El hecho de que existan genes comunes cuyo *splicing* alternativo sea regulado durante la maduración de las semillas (Srinivasan et al., 2016), la inducción de la germinación por luz R (datos mostrados en esta tesis) y la de-etiolación de la plántula (Hartmann et al., 2016), sugiere que dichos genes podrían tener roles relevantes en dichos procesos. En esta tesis demostramos que la sobre-expresión de *RS31* disminuye la sensibilidad de las semillas a la luz mediada por los fitocromos, sugiriendo un rol en la promoción de la germinación (Fig.2.4.7.1.). El gen *SR30* también está regulado por luz en nuestras condiciones (Fig.2.4.5.1. y Fig.2.4.6.3.). La expresión de *SR30* es inducida en respuesta a alta intensidad lumínica, salinidad y bajas temperaturas (Lazar & Goodman, 2000; Iida et al., 2004; Palusa et al., 2007; Tanabe et al., 2007). Otros genes de la maquinaria de *splicing* pueden ser regulados por hormonas que inhiben la germinación de semillas como el ABA (Palusa et al. 2007, Chen et al., 2013). Chen et al. (2013) demostraron que mutantes del gen de *splicing RS41* presentan hipersensibilidad al ABA durante la promoción de la germinación y el desarrollo temprano de la plántula.

Utilizando una aproximación que combina el uso de luz R, RL y mutantes de fitocromo A y fitocromo B, demostramos que los patrones de *splicing* alternativo de algunos genes son regulados por luz (*U2AF65*, *RS31*, *RS31a* y *SR30*), mientras que los patrones de los genes *PIF6*, *ABI3* y *DRM1* no pudieron ser confirmados (Fig.2.4.6.2. y Fig.2.4.6.3.). Entre los genes cuyas isoformas son reguladas por luz R, observamos que *phyA* y *phyB* regularon parcialmente los procesos de SA y el rol de cada fitocromo depende del gen considerado. *U2AF65* y *SR30* fueron parcialmente regulados por el *phyB*, *RS31a* parcialmente por el *phyA* y, si bien *RS31* fue regulado por luz R, la proporción de isoformas producidas fue independiente de *phyA* y *phyB*. Si bien estudios previos ya habían documentado el rol de la luz en el SA en otros procesos fisiológicos en *Arabidopsis* y musgos (Shikata et al., 2014; Wu et al., 2014, respectivamente), nuestros datos proveen las primeras evidencias que ponen en relevancia el rol de la luz en gatillar cambios en el SA en semillas inducidas a germinar por luz. En el musgo *P. patens* analizaron a nivel transcriptómico cambios en el SA en células de 10 días de protonememas crecidas en oscuridad durante 3 días y luego expuestas a un pulso de una hora de luz R a 25°C, manteniendo un control en oscuridad. Allí encontraron que cerca de un 50% de los genes expresan SA. La comparación de los patrones de SA entre el genotipo salvaje y la doble mutante *pubs hy2* (no sintetiza el cromóforo del fitocromo y por lo tanto es incapaz de sensar la luz R) sugiere un rol de los fitocromos en el control de la regulación del SA. Por otro lado, Shikata et al. (2012 y 2014) demostraron que los patrones de SA de los transcritos de las proteínas SR son promovidos en respuesta a luz R en plántulas y que los mutantes *phyB* y *rrc1*, cuyo gen

codifica un factor de *splicing* importante en la señalización por PHYB, muestran una disminución en la activación de la maquinaria de SA asociada a los genes *RS31*, *SR30*, *SR34b* y *U2AF65*. Estos resultados sugieren que los fotoreceptores están relacionados con la señalización lumínica que altera la abundancia relativa de las isoformas de dichos genes, no sólo en el fotocontrol de la germinación de las semillas reportado en esta tesis sino también en otros procesos del desarrollo de las plantas.

Un fenómeno claro que observamos en la regulación por luz de los genes de la maquinaria de SA es que su regulación no siempre está bajo el control de los fitocromos, como ocurre con *RS31*, *RS31a* y *SR30*. Está documentado que otros mecanismos de control pueden regular la maquinaria de SA en las plantas. En este sentido, Petrillo et al. (2014) demostraron que la regulación del SA de *RS31* no está modulada por el por PHYB en plántula, sino que es sujeto de regulación por señales retrógradas del cloroplasto. Teniendo en cuenta estos antecedentes, es posible hipotetizar que algunos de los eventos de *splicing* de los genes SR aquí evaluados podrían estar vinculados a una regulación retrógrada por mitocondrias. Sabemos que la imbibición y la luz activan la degradación de reservas de la semilla, lo que genera que se activen las mitocondrias y las señales derivadas de las mismas podrían actuar sobre el *splicing* de dichos genes de igual manera que ha sido demostrado para las señales que provienen de los cloroplastos. Por otra parte, sabiendo que la semilla recibe nutrientes de la planta madre (Hua et al., 2012), vale entonces preguntarse si, como sucede en la raíz, los azúcares podrían activar la actividad de la mitocondria y consecuentemente modular el proceso de *splicing*. Nuevos experimentos deben diseñarse para comprender los mecanismos moleculares que regulan la respuesta de germinación a la luz a través de la maquinaria de *splicing* alternativo.

2.6. CONCLUSIONES.

Los resultados expuestos en este capítulo demuestran que en semillas de *Arabidopsis thaliana*: (1) La luz R altera la expresión del ~20% del genoma de *Arabidopsis* en semillas Col-0 embebidas. (2) El control de la germinación inducida por luz R involucra la expresión de genes asociados a la actividad de enzimas de pared, al inicio de la división celular y transporte, procesos necesarios para la elongación celular del eje embrionario, pre-requisito para que ocurra la germinación. (3) La germinación inducida por luz R produce cambios en el *splicing* alternativo de genes asociados a la maquinaria de *splicing* y a los procesos de dormición y germinación. (4) El *splicing* alternativo de algunos genes es regulado a través de la acción del fitocromo B. (5) Algunos genes que presentan *splicing* alternativo, asociados a la maquinaria de *splicing*, en semillas inducidas a germinar por luz son comunes a otros procesos fisiológicos como el desarrollo de la plántula o la tolerancia a la deshidratación de las semillas.

Estos resultados ponen de relevancia el SA a nivel biológico en semillas inducidas a germinar por luz y sugieren que es un mecanismo de control post-transcripcional que genera diversidad de expresión de genes que codifican proteínas necesarias para el ajuste de la germinación por luz.

CAPÍTULO 3.

**PERFIL TRANSCRIPCIONAL INDUCIDO POR LUZ EN LA
GERMINACION DE SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*: ROL DEL
GEN *ATHB2* y DE LAS AUXINAS.**

3.1. INTRODUCCIÓN.

El transcriptoma que tiene lugar durante la germinación inducida por luz R es mediado por la acción del Pfr de phyB a través de PIF1/PIL5 (Oh et al., 2009). El fitocromo A también puede unirse a PIF1/PIL5 e inducir su degradación, sugiriendo que la promoción de la germinación mediada por phyA y phyB son parcialmente complementarias. Ibarra et al. (2013) demostraron que la germinación promovida por el phyA, cuando las semillas son expuestas a un pulso saturante de luz RL, promueve la expresión del 11% del genoma total de *Arabidopsis thaliana*. Algunos genes regulados por phyB y phyA codifican para factores de transcripción (FT) de distintas familias como HD-Zip que se caracterizan por la presencia de un homodominio ligado al motivo cierre de leucina (Ruberti et al., 1991; Chan et al., 2007). Esta familia de FT está compuesta por 47 miembros, subdividida en cuatro sub-familias llamadas HD-Zip I-IV (Sessa et al., 1994). Las proteínas de la sub-familia HD-Zip I (17 miembros) están involucradas en respuestas relacionadas al estrés abiótico, ABA, luz azul, de-etiolación y embriogénesis. Las proteínas de la sub-familia HD-Zip II (9 miembros) participan en las respuestas a la luz, el escape al sombreado y la señalización de auxinas. Las proteínas de la sub-familia HD-Zip III (5 miembros) modulan la embriogénesis y la polaridad de las hojas y las proteínas de la sub-familia HD-Zip IV (16 miembros) están asociadas a respuestas como la acumulación de antocianinas, la diferenciación de células epidérmicas, la formación de tricomas y el desarrollo de la raíz.

ATHB2/HAT4, que pertenece a la sub-familia HD-Zip II, ha sido descrito como un gen que se induce rápidamente en respuesta a cambios en la relación de luz R:RL (Carabelli et al., 1996). Se ha demostrado también que *ATHB2* es un blanco directo del factor de transcripción PIF5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5) (Hornitschek et al., 2012). La regulación positiva de *ATHB2* inducida en respuesta a bajas relaciones R:RL es mediada por el sistema de fitocromos (Carabelli et al. 1996; Steindler et al. 1997). *ATHB2*, junto con otros miembros de la misma sub-familia HD-Zip II como *ATHB4* y *HAT3*, modulan el patrón apical embrionario a través de la interacción con las proteínas HD-Zip III y promueven el transporte de auxinas y las respuestas a auxinas durante la embriogénesis (Turchi et al., 2013). En plántulas que sobre-expresan *ATHB2*, el crecimiento radicular primario como la formación de raíces laterales se ven inhibidos por altos niveles de *ATHB2* y el fenotipo de las raíces laterales de las plántulas es rescatado por el agregado de auxina exógena (Steindler et al., 1999; Morelli & Ruberti 2000, 2002). Si bien existen numerosas evidencias acerca del rol del *ATHB2* en las respuestas fotomorfogénicas en plántulas y planta adulta como así también durante la embriogénesis, su rol en los procesos de dormición y germinación de las semillas aún son nulos a pesar que sus niveles de expresión cambian significativamente en semillas que germinan a la luz (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013; Shi et al., 2013)

La promoción de la germinación de las semillas depende principalmente de factores internos asociados al balance hormonal entre GAs y ABA. Sin embargo, otras hormonas también pueden contribuir secundariamente en la germinación, como las auxinas. El conocimiento que tenemos acerca de la acción de las auxinas proviene de una amplia variedad de procesos que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Woodward & Bartel, 2005). Algunos de los procesos regulados por las auxinas son la división

celular, expansión y diferenciación. En la última década, diversos estudios generaron un avance sustancial en el entendimiento y elucidación de la vía de señalización hormonal (Nemhauser & Chory, 2005; Parry & Estelle, 2006). En plantas, las auxinas promueven la activación transcripcional mediante la degradación de los represores transcripcionales Aux/IAA (AUXIN/INDOL-3-ACETIC ACID), lo que facilita la actividad de los factores de respuesta a auxinas, ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR). En *Arabidopsis*, los Aux/IAA son una familia de proteínas compuesta por 29 miembros. Las auxinas promueven la ubiquitinación de Aux/IAA por medio de los complejos SCF TIR1/AFB (*Skp1/Cullin/F-box*), lo que promueve su degradación por el proteasoma 26S (Maraschin et al., 2009). En ausencia de Aux/IAA, los ARFs, que en *Arabidopsis* están codificados por 23 genes, se unen a la región promotora de los genes de respuesta activando o reprimiendo la transcripción (Ulmasov et al., 1997a; Okushima et al., 2007). Así, las auxinas suprimen el efecto represor de los complejos Aux/IAA sobre los ARF y se produce la transcripción de los genes blanco promovidos por la hormona.

El rol de las auxinas en la dormición y germinación de semillas no ha sido del todo explorado. Semillas mutantes de elementos de señalización de las auxinas presentan menores niveles de dormición, mientras que la potenciación de la señalización o el transporte de auxinas incrementan los niveles de dormición de las semillas (Liu et al., 2013). Cuando los niveles de auxinas en las semillas son bajos, la dormición disminuye porque *AXR2* (*AUXIN RESISTANT 2*) y *AXR3* (*AUXIN RESISTANT 3*) inactivan a *ARF10* y *ARF16*, quienes regulan positivamente la expresión de *ABI3* (*ABA INSENSITIVE 3*), un regulador central que impone dormición en las semillas (Liu et al., 2013). Si por el contrario hay activación de la vía de señalización de las auxinas, éstas se unen a los receptores TIR1/AFB, promoviendo en consecuencia la degradación de *AXR2* y *AXR3*, lo que promueve la actividad de *ARF10* y *ARF16* manteniendo activa la expresión de *ABI3* (Liu et al., 2013). Mediante una aproximación transcriptómica, Ogawa et al. (2003) encontraron que genes de biosíntesis y transporte de auxinas como las proteínas *PIN2* (*PIN-FORMED 2*) y *PIN7* (*PIN-FORMED 7*) son promovidos cuando la germinación de las semillas de *Arabidopsis* es inducida por GA exógena e inhibidos por ABA. Por otra parte, las auxinas son necesarias para la respuesta asociada al ABA que inhibe el crecimiento del eje embrionario luego de la emergencia de la radícula (post-germinación), a través de la acción de componentes auxínicos del transporte como *AUX1* y *PIN2* (Belin et al., 2009). El ABA reprime la expresión de *AXR2* y *AXR3* durante el crecimiento del eje embrionario (Belin et al., 2009) y concuerda con el fenotipo de los mutantes homocigotas *axr2/iaa7* y *axr3/iaa17* que muestran una tasa acelerada de crecimiento del eje embrionario en presencia de ABA (Belin et al., 2009).

El fotocontrol de la germinación puede alterar la expresión de genes asociados a las auxinas (Ibarra et al., 2013). El análisis del transcripoma de semillas que germinan con un RLp indica que el *phyA* regula positiva y tempranamente (5 hs después del pulso de luz) la expresión de *ARF18*, *AXR1*, *AXR4*, *ATMYB34* (*MYB DOMAIN PROTEIN 34*) y transportadores de auxinas como *PIN1*, *PIN2* y *PIN7* en semillas de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, genes asociados al metabolismo de las auxinas como *CYP79B2* (*CYTOCHROME P450, FAMILY 79, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 2*) y *NIT3* (*NITRILASE 3*) son reprimidos por luz (Ibarra et al., 2013). Estos resultados están en concordancia con otro trabajo en donde evalúan los genes regulados por el módulo PIF1/PIL5-HFR1 que media la germinación dependiente de *phyB* (Shi et al., 2013). Estos autores observaron que, en semillas embebidas a las 12 horas después del

tratamiento de luz, varios genes de señalización y transporte de auxinas son promovidos como *AUX1/3* (*AUXIN RESISTANT*), *PIN1/2/3/7*, *SUR1/2* (*SUPERROOT*) y *IAA16* (*INDOLEACETIC ACID-INDUCED PROTEIN 16*) (Shi et al., 2013). Por otra parte, la expresión de *AUX1* es reprimida por SNL1 (SWI-INDEPENDENT3 (SIN3)-LIKE1) y SNL2, dos miembros del complejo de desacetilación de histonas (Wang et al., 2013). La pérdida de función de SNL1 y SNL2 causa un aumento significativo en la expresión de varios genes de auxinas, incluyendo a *AUX1*, un regulador positivo de la germinación que actúa río debajo de SNL1/SNL2 (Wang et al., 2016). Estos resultados sugieren que *AUX1* estaría involucrado en el crecimiento radicular y la germinación transportando auxinas y modificando su acumulación en el tip de la radícula. Si bien los estudios transcriptómicos en semillas de *Arabidopsis thaliana* que germinan a la luz demuestran que las auxinas y transportadores son necesarios, aún no hay estudios funcionales que conecten la actividad de los transportadores de auxinas en el fotocontrol de la germinación.

3.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar la acción del gen *ATHB2* en la germinación inducida por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*.
2. Evaluar la función de las auxinas y la relevancia de su transporte en la germinación inducida por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Hipótesis asociadas:

1. El factor de transcripción *ATHB2* es un inhibidor de la germinación inducida por luz.
2. El factor de transcripción *ATHB2* participa en la vía de señalización hormonal del ABA.
3. Las auxinas son hormonas relevantes en el proceso de germinación mediado por luz y su acción involucra mecanismos asociados a su transporte.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.3.A. Condiciones de cultivo de las plantas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 fueron sembradas en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) transparentes conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada y se incubaron a 5°C durante 7 días. Transcurrido ese período, se les dio un pulso saturante de R de 2 horas, volviendo luego a oscuridad por 24 horas a 25°C. Finalmente, se expusieron a luz blanca para promover su crecimiento y ser luego trasplantadas en recipientes plásticos de 110 cm³ con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (proporción 2:2:1). Las plantas fueron regadas durante su ciclo de vida con una solución nutritiva de Hakaphos (13-40-13+MgO+M.E). Las plantas fueron cultivadas condiciones de día largo (16h luz/8h oscuridad, 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiancia, tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54) con temperaturas que oscilaron entre 18°C y 23°C, hasta el momento de la cosecha. Las semillas fueron cosechadas en el momento en que todas las silicuas estuvieran completamente secas y luego fueron almacenadas en tubos abiertos dentro de un recipiente hermético provisto con sílica gel a temperatura constante de 20°C y oscuridad.

3.3.B. Caracterización funcional de ATHB2.

3.3.B.1. Genotipos utilizados en los ensayos fisiológicos: Se utilizaron las siguientes líneas mutantes y transgénicas, cedidas gentilmente por el laboratorio de la Dra. Ida Ruberti (National Research Council. Institute of Molecular Biology and Pathology – CNR), todas en fondo genético Col-0. (a) Mutantes de pérdida de función: *athb2-1* (Salk_106790. Khanna et al., 2006) y *athb2-3* (Babyichuk et al., 1997); (b) Mutantes de ganancia de función: *athb2-2* (Salk_006502); (c) Líneas transgénicas: ATHB2:ATHB2:GUS y 35S::3HA:ATHB2.

3.3.B.2. Diseño experimental y ensayos fisiológicos de germinación.

3.3.B.2.a. Cinética de germinación en luz blanca continua de las líneas mutantes y transgénicas: se sembraron 6 réplicas biológicas de 20 semillas cada una en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) cada una conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas embebidas por 2 horas en oscuridad se irradiaron con un pulso saturante de RL (RLp, 20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron a 5°C por 3 días. Luego de este período se pasaron las cajas a la cámara Percival, con un régimen lumínico de 24 horas luz blanca y 22°C. Se contó la germinación de las semillas durante períodos de tiempo que variaron entre las 0 y 168 horas de incubación en luz.

3.3.B.2.b. Ensayos de sensibilidad hormonal al ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) de las líneas Col-0 y athb2-1: se sembraron 6 réplicas biológicas de 20 semillas cada una sobre papeles de filtro en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm). Los papeles de filtro fueron embebidos con 750 μL de solución hormonal. Se utilizaron distintas concentraciones de ABA (0 μM , 0.1 μM y 1 μM) o GA₄ (0 μM , 0.1 μM y 1 μM) en presencia de inhibidores de ABA (Fluridona, Sigma-Aldrich, Steinheim,

Germany) o GA (Paclobutrazol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). La concentración utilizada de paclobutrazol fue de 50 μM mientras que la de fluridona fue de 100 μM . Las concentraciones de inhibidores utilizadas fueron escogidas a partir de curvas de respuesta realizadas para determinar los valores mínimos necesarios para bloquear completamente la actividad de las hormonas evaluadas (Figura Anexo 3.4.1.3.1.). Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas embebidas por 2 horas en oscuridad se irradiaron con un RLp (20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron a 5°C por 3 días. Luego de este período se pasaron las cajas a la cámara Percival, con un régimen lumínico de 24 horas luz blanca y 22°C. Se contó la germinación de las semillas a las 72 horas de incubación en luz.

3.3.B.3 Evaluación de los niveles de transcriptos en Col-0 y *athb2-1*.

3.3.B.3.a. *Diseño experimental y extracción de las muestras utilizadas*: se sembraron 3 muestras biológicas de semillas Col-0 y *athb2-1* (10 a 15 mgs cada una) para cada genotipo sobre papel de filtro embebido en agar-agua 0,8 % (p/V). El protocolo experimental fue igual al mencionado en el punto 3.B.2.a., pero luego del pasaje a la cámara Percival, las semillas se incubaron a 22°C en luz continua durante 12 hs, momento en el que se procedió a la cosecha de las muestras. Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la extracción del ARNm.

3.3.B.3.b. *Extracción y cuantificación del ARN*: se realizó la extracción del ARN de 3 muestras biológicas para cada uno de los genotipos. El ARN total de semillas fue extraído utilizando el kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA fue eluido en un volumen final de elución de 50 μL . Se determinaron la calidad y concentración ARN mediante espectrofotometría y gel de agarosa. Para cuantificar el ARN mediante espectrofotometría se utilizaron 2 μL de muestra diluida en 398 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos presentan su máximo de absorción a 260 nm y que las proteínas lo hacen a 280 nm, se evaluó la relación de absorbancias en estas dos longitudes de onda para determinar la pureza del material genético (relación 260/280). Una relación óptima de trabajo ronda el valor de 1.8. Se procedió luego a la determinación de la calidad del ARN mediante la corrida en un gel de agarosa 2% con Bromuro de Etidio con el fin de descartar la posible presencia de ADN en la muestra o bien de ARN degradado.

3.3.B.3.c. *Síntesis del ADN copia a partir del ARN obtenido*: una vez obtenido el ARN, se procedió a realizar el tratamiento de las muestras con DNasa (para evitar la posible interferencia de ADN contaminante en el ARN obtenido), empleando la enzima RQ1 RNase-Free Dnase (Promega). Se utilizó como material de partida 1 μg de ese ARN y se sintetizó el ADN copia utilizando la enzima MMLV High Performance Reverse Transcriptase (Epicentre). El protocolo fue el siguiente: se trató 1 μg de ARN total con una mix de 2 μL de DNasa + 1 μL de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega). Esta solución fue incubada durante de 30 minutos a 37°C. Luego se añadió con 1 μL de Stop Solution (Promega) y se incubó durante 10 minutos a 65°C para inactivar la DNasa. A continuación, se agregaron 2 μL de oligodT 100 mM y se incubó durante 2 minutos a 65°C para luego incubar esta solución durante 1 minuto en hielo. Finalmente se adicionaron 6,5 μL de la mix de RT (2 μL de MMLV HP RT 10X

Reaction Buffer + 2 μL de DTT 100 mM + 1 μL de dNTPs mix 10 mM + 1.5 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$ y 0.5 μL de MMLV High Performance Reverse Transcriptase Enzyme (200 U/ μL), obteniendo un volumen final de reacción de 20 μL . Esta solución se incubó durante 1 hora a 37°C, 5 minutos a 85°C y 1 minuto en hielo.

3.3.B.3.d. Análisis de expresión génica: una vez obtenido el ADN copia se procedió a la medición de los genes candidatos mediante la técnica de Real Time PCR. La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo, en un volumen final de reacción de 10 μL : se preparó una solución mix de 5 μL de FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) + 1 μL de primer mix forward y reverse 5 μM + 2 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$ + 2 μL ADN copia por reacción. La amplificación se realizó utilizando el siguiente programa: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C más 1 min a T_m . Dado que el SYBR Green produce fluorescencia al unirse a moléculas de ADN doble cadena, pero de manera inespecífica a la secuencia, parte de la fluorescencia emitida puede corresponder a productos de amplificación inespecífica, o a dimerizaciones entre primers. Para verificar que el total de la fluorescencia emitida corresponde al producto de amplificación esperado, luego de la amplificación se realizó una reacción de disociación, mediante la cual se obtiene el valor de la temperatura de disociación del amplicón. La reacción de disociación se llevó a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a T_m y 15 segundos a 95°C. La reacción de PCR y la cuantificación de la fluorescencia fueron realizadas con el equipo ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para cada punto se evaluaron tres muestras biológicas independientes. De cada muestra se realizaron dos réplicas técnicas, y el promedio de estos dos valores se tomó como una repetición. Los datos de expresión de los genes de cada muestra fueron relativizados al nivel de expresión del gen PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A). Las secuencias de los primers utilizados se encuentran en la Tabla Anexo 3.4.1.4.

3.3.C. Rol de las auxinas en la germinación.

3.3.C.1. Genotipos utilizados en los ensayos fisiológicos: Se utilizaron las siguientes líneas: (a) Líneas salvajes: Ler y Col-0; (b) Líneas mutantes: *pin3.3* (Friml et al., 2002), *pin3.4* (Salk_038609), *pin7.1* (Salk_044687C), *pin7.2* (CS9366) y *aux1* (CS859699).

3.3.C.2. Cuantificación de los niveles hormonales: se sembraron 6 réplicas biológicas de semillas (5-10 mg) para cada tratamiento evaluado. Las muestras cosechadas en cada condición se almacenaron a -80°C hasta el momento en el que se enviaron en hielo seco al laboratorio de la Dra. Karin Ljung para proceder a la cuantificación (Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, SE-901 83, Umeå, Sweden). Los niveles de auxina se midieron mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

3.3.C.3. Ensayos de sensibilidad hormonal: se sembraron 6 réplicas biológicas de 20 semillas cada una sobre papeles de filtro en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm). Los papeles de filtro fueron embebidos con 750 μL de solución hormonal. Se utilizaron distintas concentraciones de 1-NOA, un inhibidor de transportadores de influjo auxínico naptalam (10 μM , 100 μM , 200 μM y 500 μM), NPA, un inhibidor de transportadores de eflujo auxínico (50 μM , 100 μM , 150 μM y 200 μM), PICLORAM (0.1 mM, 1 μM ,

10 μM y 100 μM) y ABA (0.2 μM , 0.4 μM , 0.6 μM y 0.8 μM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas embebidas por 2 horas en oscuridad se irradiaron con un pulso saturante de RLp (20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas con las semillas se envolvieron con bolsas plásticas de color negro y se incubaron a 5°C por 3 días. Luego se irradiaron por 20 minutos con un pulso saturante de R (estableciendo una relación Pfr/P de 0,87, 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), manteniéndose un control en oscuridad. Luego de los tratamientos de luz, las cajas de plástico con las semillas se incubaron en oscuridad a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la observación de la radícula a simple vista.

3.3.C.4. Ventana de sensibilidad al NPA: se sembraron 6 réplicas biológicas de 20 semillas cada una sobre papeles de filtro en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm). Los papeles de filtro fueron embebidos con 750 μL de solución hormonal o agua, según el momento del experimento. Las semillas embebidas en una solución de NPA 200 μM se incubaron durante 2 horas en oscuridad y luego se irradiaron con un pulso de RL. Luego del pulso se incubaron durante 3 días a 5°C y se irradiaron con un pulso de R. Finalizado el pulso de R, las semillas sembradas sobre los papeles de filtro embebidos con NPA se transfirieron a nuevos papeles de filtro embebidos en agua destilada, a distintos tiempos post-pulso (0 hs, 5 hs, 24 hs, 30 hs y 48 hs), manteniéndose un control en agua y un control en NPA 200 μM . Todos estos pasajes se realizaron en oscuridad. Luego del pulso de R, las cajas de plástico con las semillas se incubaron en oscuridad a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la observación de la radícula a simple vista.

3.4. RESULTADOS.

SECCIÓN 3.4.1.

3.4.1.1. Análisis de genómica funcional de factores de transcripción que controlan la germinación inducida por luz.

Tomando como punto de partida la base de datos generada a partir del RNAseq comentado en el capítulo anterior, decidimos realizar un análisis adicional que nos permitiera evaluar la presencia de factores de transcripción (FT) que pudieran estar modulando la germinación mediada por luz R. Para ello generamos un listado en Microsoft Excel con todos los ATG de los factores de transcripción anotados a la fecha (utilizando la página web <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>; Perez-Rodriguez et al., 2009). Una vez obtenido este listado, procedimos a cruzarlos con nuestros datos transcriptómicos utilizando fórmulas generadas en Microsoft Excel que nos permitieran identificar cuántos y cuáles factores de transcripción anotados están presentes en nuestro transcriptoma. Los resultados de estos análisis arrojaron que la luz R modifica significativamente la expresión de diferentes familias de factores de transcripción, representando un ~8.50 % del total del transcriptoma (492 genes; FR: 1.2; $p < 1.932e^{-08}$). Luego clasificamos en UP o DOWN regulados a dichos genes, observando que 251 genes pertenecen a la primera categoría y 241 a la segunda categoría (Fig.3.4.1.1.1. y Tabla Anexo 3.4.1.1.1.A-B.).

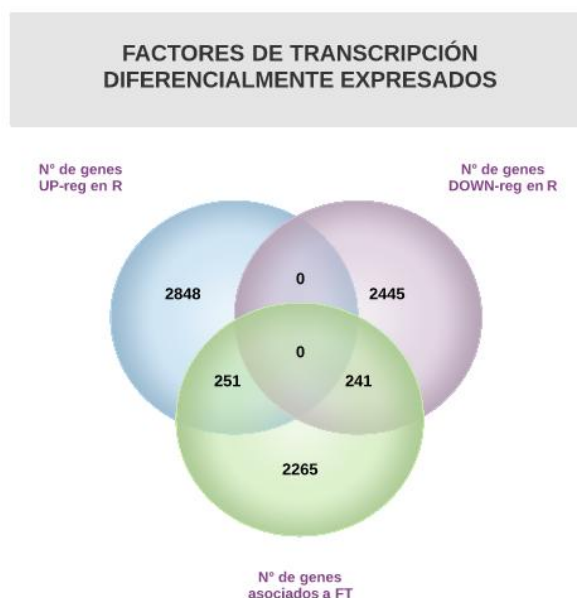


Fig. 3.4.1.1.1. Factores de Transcripción diferencialmente expresados en respuesta a la luz R. FT: factor de transcripción; R: rojo; Nº: número.

Los FT sobre-representados pertenecen a familias tales como C3H, HD-Zip, bHLH, MYB, B-BOX, WRKY y GRAS, entre otras familias (Fig.3.4.1.1.2.). Entre otros, se han encontrado genes vinculados a (a) respuestas a la luz como *PIL1*, *PIL2*, *SPT* y *ATHB2/HAT4*; (b) señalización de ABA como *FUS3*, *ABI4* y *ABI5*; (c) señalización de GAs como *SCL3* y *RGL1* y (e) ritmo circadiano como *PRR1/3/5/7/9*, *TOC1*, *LHY1* y *CCA1*.

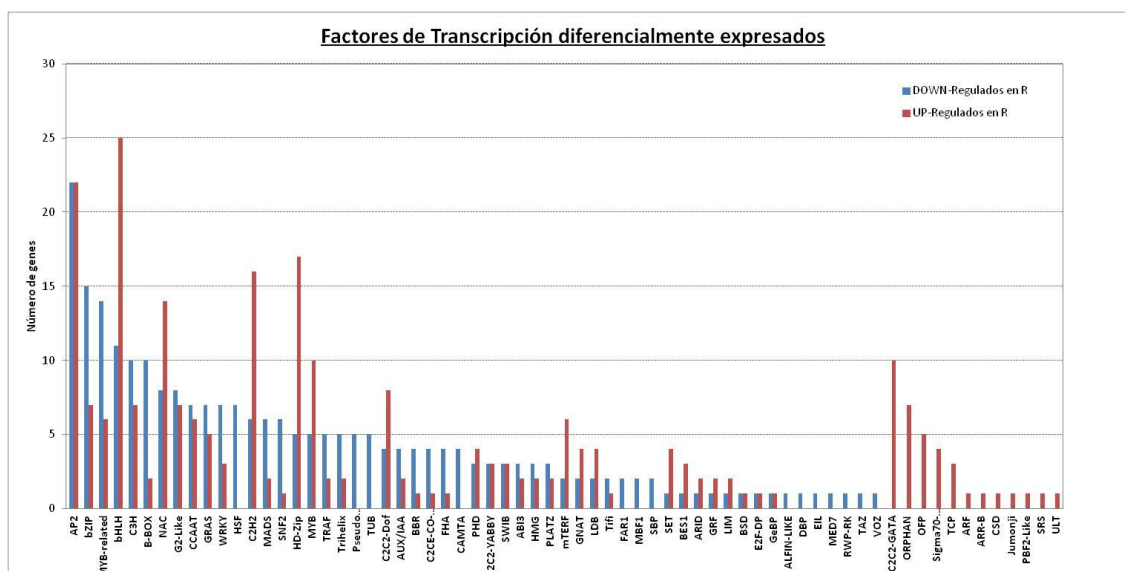


Fig. 3.4.1.1.2. Familias de Factores de Transcripción diferencialmente expresados en respuesta a la luz roja.

Cuando analizamos en detalle nuestra base de datos encontramos que entre nuestros genes DOWN-regulados en R, *ATHB2* surgía entre los primeros 20 genes con mayor tasa de cambio en su expresión ($\log FC = 4.5740609$; $p = 2.72E^{-215}$; Fig. Anexo 3.4.1.1.1.). Estos resultados son similares a los documentados por otros autores, en los cuales la promoción de la germinación por luz R o RL también modula la expresión de *ATHB2* (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013; Shi et al., 2013). El transcriptoma mediado por phyA demostró que dicho fitocromo regula negativamente la expresión de *ATHB2* a las 5 hs después de irradiar las semillas embebidas con un RLp (Ibarra et al., 2013). PIF1/PIL5, un potente inhibidor de la germinación inducida por el phyB, regula positivamente la expresión de *ATHB2* a las 12 hs después de irradiar las semillas embebidas con un Rp (Oh et al., 2009; Shi et al., 2013). Estos datos indican que *ATHB2* es un componente necesario en la germinación que participa en las vías de señalización de los fitocromos A y B; y que se expresa tempranamente después del pulso de luz (entre 5 a 12 hs después del estímulo).

3.4.1.2. *ATHB2* es un gen que reprime la germinación en luz blanca.

Con el objetivo de evaluar el rol funcional de *ATHB2* en la germinación inducida por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*, evaluamos la respuesta de líneas mutantes y sobre-expresantes de *ATHB2*, manteniendo a Col-0 como genotipo control. Las semillas se incubaron durante tres días a 5°C en completa oscuridad, momento en el cual se expusieron a luz blanca continua y 22°C. Se evaluó la germinación de las semillas durante 7 días (168 hs). Los valores de porcentaje de germinación fueron transformados mediante transformación angular para la evaluación estadística. La comparación de medias se realizó mediante análisis de ANOVA de dos factores seguido por test de Fisher ($p < 0.05$), comparando contra el genotipo salvaje Col-0.

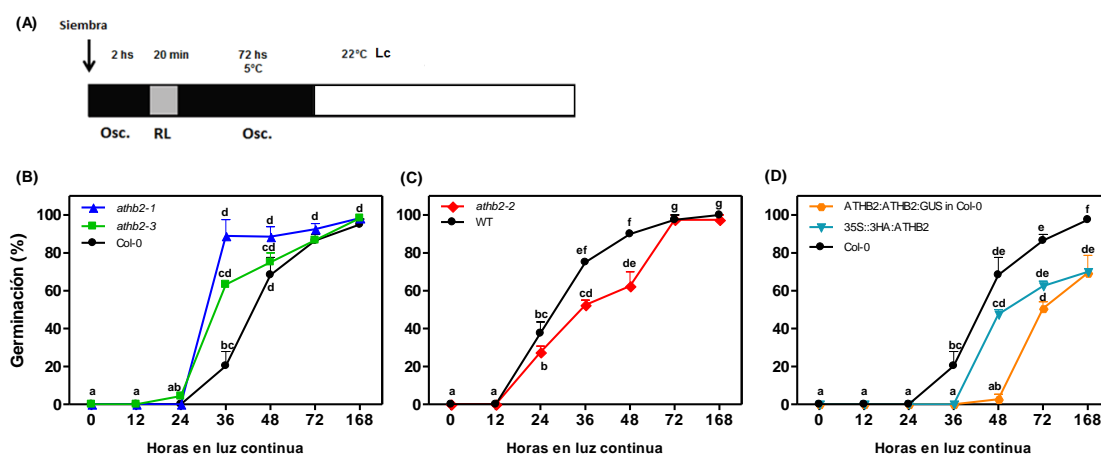


Fig. 3.4.1.2.1. *ATHB2* es un represor de la germinación. (A) Protocolo experimental utilizado para evaluar la promoción de la germinación por luz. (B-D) Germinación de semillas Col-0 y (B) líneas mutantes y (C-D) líneas transgénicas de *ATHB2* embebidas en oscuridad a 5°C durante tres días, previos a la exposición a luz blanca continua. Se representa la media \pm ES (n=6). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher a $p < 0.05$. Osc: oscuridad, RL: rojo lejano, Lc: luz blanca continua.

La Figura 3.4.1.2.1. muestra los porcentajes de germinación en función de las horas de incubación en luz blanca continua. Se observó que las semillas salvajes Col-0 comienzan a germinar a las 24 hs alcanzando su valor por encima del 90% de germinación a los 7 días. A las 48 hs, un 50% de la población ya había germinado (Fig.3.4.1.2.1.B.). Por el contrario, semillas que no expresan el gen *ATHB2* aceleraron la cinética de germinación (mutantes *athb2-1* y *athb2-3*). Semillas de ambos genotipos germinaron por encima del 50% a las 36 hs de exposición a la luz (Fig.3.4.1.2.1.B.). Por el contrario, la sobre-expresión de *ATHB2* redujo la velocidad de germinación en las semillas de las líneas *athb2-2*, ATHB2:ATHB2:GUS y 35S::3HA:ATHB2 (Fig.3.4.1.2.1.C-D). Los resultados de estos experimentos indican que *ATHB2* reprime la velocidad y, en ciertos casos, el porcentaje final de germinación de las semillas en nuestras condiciones.

3.4.1.3. *ATHB2* inhibe la germinación a la luz a través de la vía de señalización del ABA.

Con el propósito de determinar si la ausencia de *ATHB2* modifica la sensibilidad de las semillas al ABA y las GAs, realizamos ensayos de respuesta a distintas dosis de ABA y GA₄ en presencia de Fluridona (F) o Paclobutrazol (P), dos inhibidores de la biosíntesis de ABA y GA, respectivamente. Previamente se realizó una curva de respuesta a F y P para identificar la concentración mínima necesaria para inhibir la acción de las hormonas sintetizadas de modo endógeno. La dosis necesaria de los inhibidores fue de 100 μ M en el caso de F y 50 μ M en el caso de P (Figura Anexo 3.4.1.3.1.).

La Figura 3.4.1.3.1. muestra la curva de respuesta de sensibilidad al ABA de semillas salvajes Col-0 y mutante *athb2-1*. Las semillas Col-0 germinaron un ~92 % y las semillas *athb2-1* germinaron al 100% sin agregado de ABA. Una dosis de ABA 0.1 μ M redujo la germinación de Col-0 en ~40% mientras que las semillas *athb2-1* no modificaron sus niveles de germinación. El agregado de ABA 1 μ M inhibió completamente la germinación, independientemente del genotipo evaluado (Fig.3.4.1.3.1.A.). Cuando se evaluó la sensibilidad de las semillas a las GAs, no se observaron diferencias significativas de germinación entre ambos genotipos en todo el rango de concentraciones evaluado desde 0 a 1 μ M de GA que promovió la germinación en un rango de respuesta entre 20 a 90% de germinación (Fig.3.4.1.3.1.B). Los resultados de estos experimentos sugieren que la ausencia de *ATHB2* modifica la sensibilidad de las semillas al ABA pero no a GA.

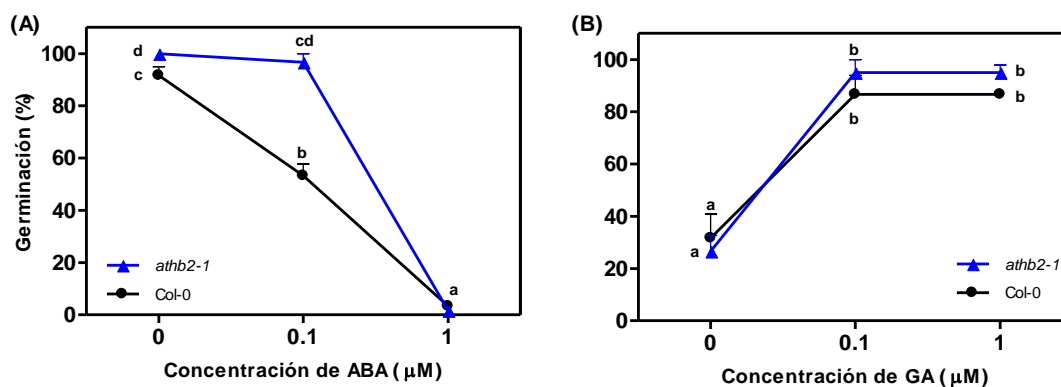


Fig. 3.4.1.3.1. La ausencia de *ATHB2* modifica la sensibilidad de las semillas al ABA pero no a las GAs. Germinación de semillas Col-0 y *athb2-1* embebidas en oscuridad a 5°C durante tres días, previos a la exposición a luz blanca continua. Las semillas se incubaron durante todo del tratamiento en presencia de soluciones de concentraciones crecientes de (A) ABA, utilizando fluridona 100 μ M como inhibidor de síntesis endógena y (B) GA₄, utilizando paclobutrazol 50 μ M como inhibidor de síntesis endógena. Se representa la media \pm ES (n=6). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher a $p < 0.05$.

3.4.1.4. La expresión de genes vinculados al metabolismo y señalización del ABA están desregulados en las semillas mutantes *athb2-1*.

Con el objeto de tener una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la germinación inducida por luz, se analizó la expresión de genes vinculados a: (a) vía de las GAs, (b) vía del ABA, (c) genes de la germinación y (d) transporte de auxinas. Se extrajo ARN de semillas Col-0 y *athb2-1* incubadas durante 3 días a 5°C y expuestas a 12 horas en luz blanca continua. Se cosechó el material y se realizaron las qRT-PCR correspondientes para cada gen. En paralelo realizamos una prueba de fisiología que acompañara los datos de expresión y confirmara el fenotipo previamente documentado de la mutante (Fig.3.4.1.4.1.).

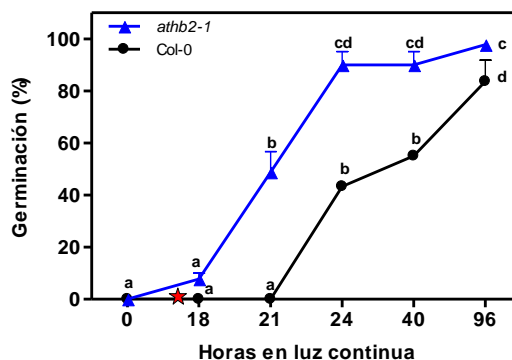


Fig. 3.4.1.4.1. *ATHB2* es un represor de la germinación. Germinación de semillas Col-0 y mutante de *ATHB2* embebidas en oscuridad a 5°C durante tres días, previos a la exposición a luz blanca continua. Se representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher a $p < 0.05$. ★ representa el momento en el que se cosecharon las muestras (12 horas).

Se evaluó la expresión de genes asociados al metabolismo y señalización de las GAs y el ABA. La ausencia de *ATHB2* no modificó la expresión del gen *GA3ox1*, que promueve la síntesis de GA activas (Fig.3.4.1.4.2.A.). Se observa un patrón general de inhibición de la transcripción de genes asociados a la síntesis y señalización de ABA. La ausencia de *ATHB2* reprimió significativamente la expresión de *NCED9*, un gen necesario para sintetizar ABA activo en las semillas (Fig.3.4.1.4.2.B). Entre los genes de señalización de ABA se evaluaron los niveles de expresión de dos factores de transcripción (*ABI3* y *ABI5*), observándose que los niveles de transcritos de ambos genes disminuyeron significativamente en las semillas *athb2-1* con respecto a Col-0 (Fig.3.4.1.4.2.C.). Los niveles de expresión de *PIL5*, *XERICO* y *SOMNUS*, tres genes documentados por reprimir la germinación de las semillas (Kim et al., 2008;

Piskurewicz et al., 2008; Oh et al., 2009) fueron significativamente menores en semillas *athb2-1* con respecto al genotipo control mientras que la expresión de *SPATULA*, un gen que reprime la germinación de las semillas en respuesta al frío (Penfield et al., 2005) no cambió (Fig.3.4.1.4.2.D.). Estos datos de expresión están en concordancia con el fenotipo de germinación de las semillas mutantes *athb2-1* confirmando que el factor de transcripción *ATHB2* inhibe la germinación de las semillas a través de la vía de señalización del ABA.

Dado que se ha documentado que algunos miembros de la familia HD-Zip regulan el desarrollo mediante la vía de señalización de las auxinas (Steindler et al., 1999; Turchi et al., 2013), decidimos evaluar si bajo nuestras condiciones *ATHB2* modula la expresión de genes asociados a auxinas. La expresión de *AUX1*, un transportador de influjo de auxinas, no mostró variaciones significativas entre Col-0 y *athb2-1*, mientras que la ausencia de *ATHB2* incrementó significativamente la expresión de *PIN7*, un transportador de eflujo de auxinas (Fig.3.4.1.4.2.E.). Estos datos sugieren que *ATHB2* inhibe la expresión de *PIN7*, inhibiendo el transporte de auxinas en nuestras condiciones.

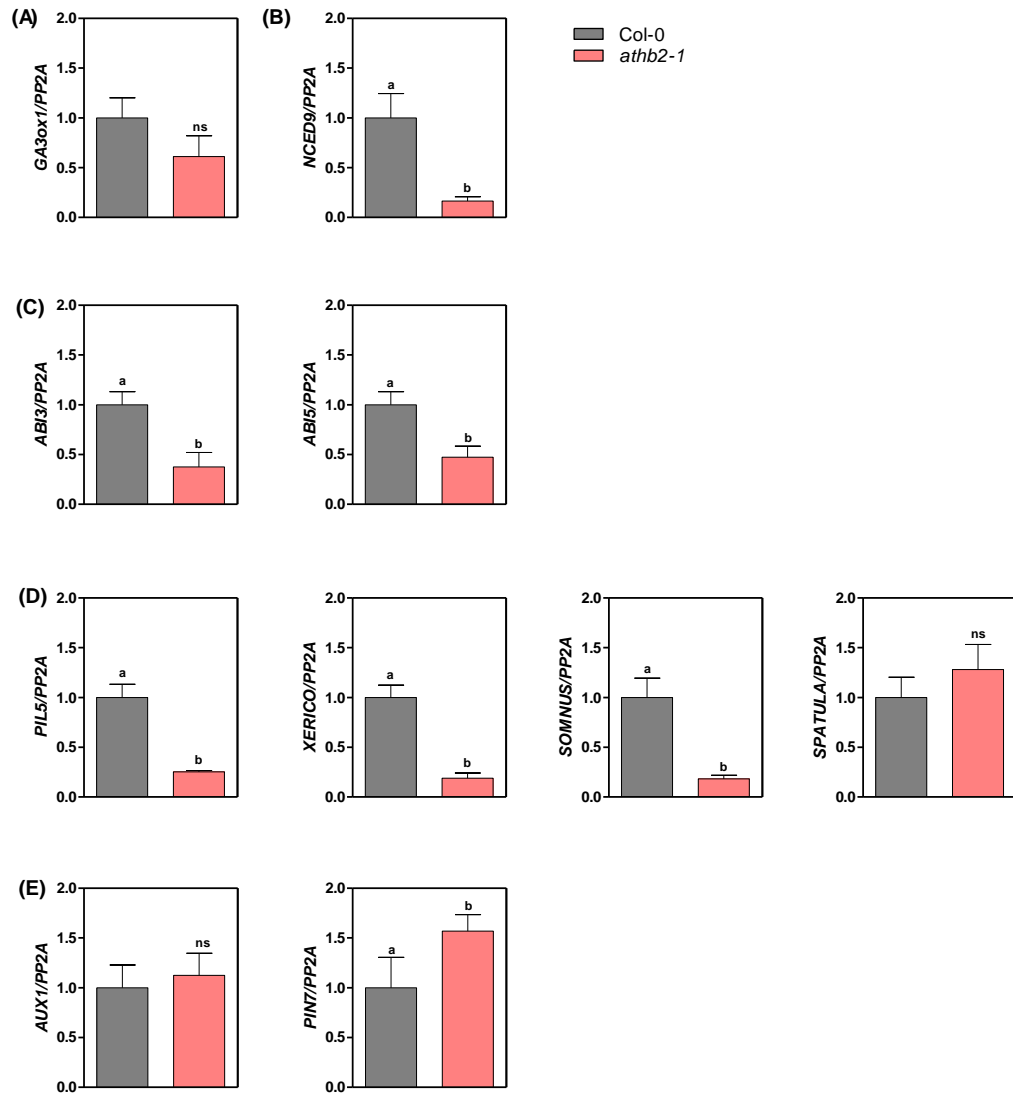


Fig. 3.4.1.4.2. Niveles mayores de germinación de *athb2-1* vs *Col-0* correlacionan con una disminución en la expresión génica de reguladores negativos de la germinación. Expresión de (A) un gen de la vía de síntesis de GA (*GA3ox1*), (B) un gen de la vía de síntesis del ABA (*NCED9*), (C) dos genes de la señalización del ABA (*ABI3* y *ABI5*), (D) cuatro genes de la germinación (*PIL5*, *XERICO*, *SOMNUS* y *SPATULA*) y dos genes del transporte de auxinas (*AUX1* y *PIN7*) en respuesta a incubación en luz blanca continua en semillas *Col-0* y *athb2-1*. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante una prueba de T a $p < 0.05$.

SECCIÓN 3.4.2.

3.4.2.1 Perfil hormonal asociado a la germinación inducida por luz R: relevancia de las auxinas.

Tomando como punto de partida la base de datos generada a partir del RNAseq, decidimos realizar un análisis adicional que nos permitiera validar que la expresión de genes de diferentes vías de señalización hormonal se ve afectada en respuesta al estímulo de luz. Para ello generamos un listado en Microsoft Excel con todos los ATG de los genes pertenecientes a las 7 vías hormonales (ABA, auxina, GA, etileno, ácido jasmónico, citoquinina y brasinosteroides) anotados a la fecha, utilizando la página web <http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/virtualplant.cgi> (Katari et al., 2010). Una vez obtenido este listado, procedimos a cruzarlos con nuestros datos transcriptómicos utilizando fórmulas generadas en Microsoft Excel que nos permitieran identificar cuántos y cuáles genes se ven modulados por acción de la luz R en nuestras condiciones experimentales.

El grupo de genes regulados por luz R se encontró enriquecido significativamente por genes hormonales (FR: 1.3; $p < 4.22e^{-10}$), representando un 13.25% del total de nuestro transcriptoma. Luego clasificamos en UP o DOWN regulados a dichos genes, observando que 203 genes son UP regulados (FR: 1.3; $p < 1.899e^{-5}$) y 178 genes son DOWN regulados (FR: 1.3; $p < 3.527e^{-5}$). La vía de señalización por auxina fue la segunda vía hormonal sobre-representada significativamente en respuesta a la luz R (FR: 1.2; $p < 0.0047$) con 89 genes regulados significativamente por luz, luego de la vía del ABA, la vía de señalización con más genes regulados (125 genes, Fig.3.4.2.1.1.). Estos datos sugieren que las auxinas son importantes en la regulación de la germinación por luz.

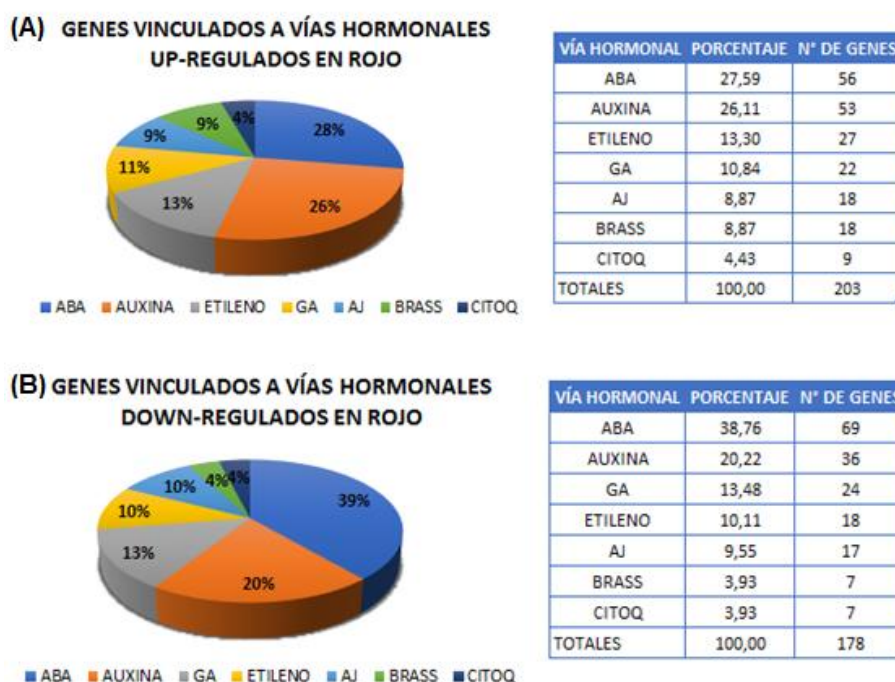


Fig. 3.4.2.1.1. Genes diferencialmente expresados en respuesta a la luz R. Gráfico de torta que representa los porcentajes de cada vía de señalización hormonal junto con la tabla que esquematiza los valores porcentuales y números de genes de cada vía de señalización hormonal. (A) El porcentaje total se calculó en base al total de genes hormonales UP-regulados en el transcriptoma (203 genes). (B) El porcentaje total se calculó en base al total de genes hormonales DOWN-regulados en el transcriptoma (178 genes). ABA: ácido abscísico; GA: ácido giberélico; AJ: ácido jasmónico; BRAS: brasinoesteroides; CITOQ: citoquininas.

Luego indagamos sobre los genes vinculados a la vía de señalización de auxina que se encuentran modulados por luz R. 53 genes fueron UP-regulados y 36 genes fueron DOWN-regulados por luz R (Fig.3.4.2.1.2.A. y Tabla Anexo 3.4.2.1.1.A-B.). Entre estos genes encontramos genes de respuesta, transporte, metabolismo y homeostasis de auxina (Fig.3.4.2.1.2.B.). Algunos de los genes UP-regulados fueron *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN7*, *AUX1* y *SAV3*, mientras que entre los genes DOWN-regulados encontramos a IAA (i.e. *IAA10*, *IAA30*, *IAA34*) y genes *SAUR-like*. Estos resultados sugieren que las auxinas son relevantes en el proceso de la germinación mediada por luz y que su acción involucra diversos mecanismos asociados a la señalización y transporte.

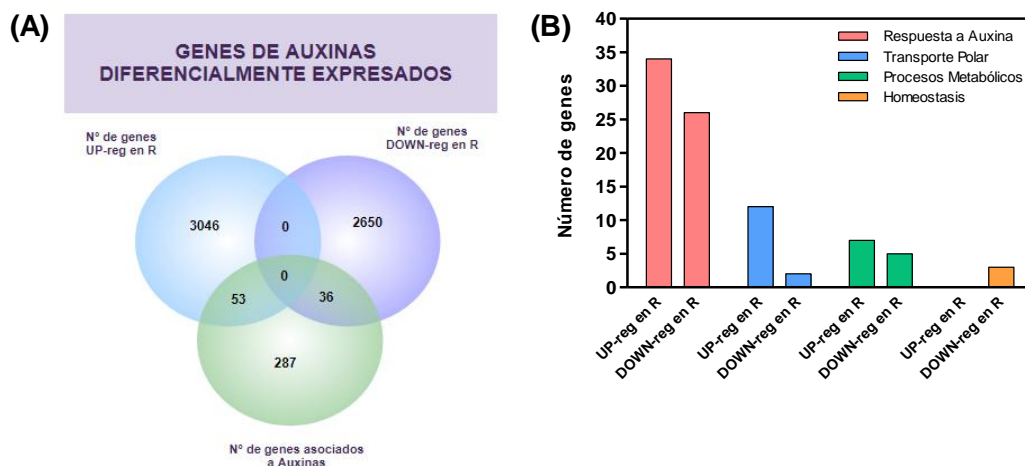


Fig. 3.4.2.1.2. Genes de auxinas diferencialmente expresados en respuesta a la luz roja. (A) Diagrama de Venn que esquematiza cuántos genes están representados en cada categoría. (B) Clasificación ontológica de dichos genes.

3.4.2.2. Identificación de componentes auxínicos asociados a las vías de señalización por luz.

Realizamos meta-análisis de transcriptomas para identificar genes de interés asociados con la vía de señalización de las auxinas que podrían estar involucrados en la regulación de la germinación por luz. En los meta-análisis comparamos genes regulados (a) por la acción de phyB (Oh et al., 2009; Shi et al., 2013) y (b) genes regulados por la acción del phyA (Ibarra et al., 2013) para identificar componentes comunes y específicos entre ambas vías de señalización por luz (Fig.3.4.2.2.1. y Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A-B).

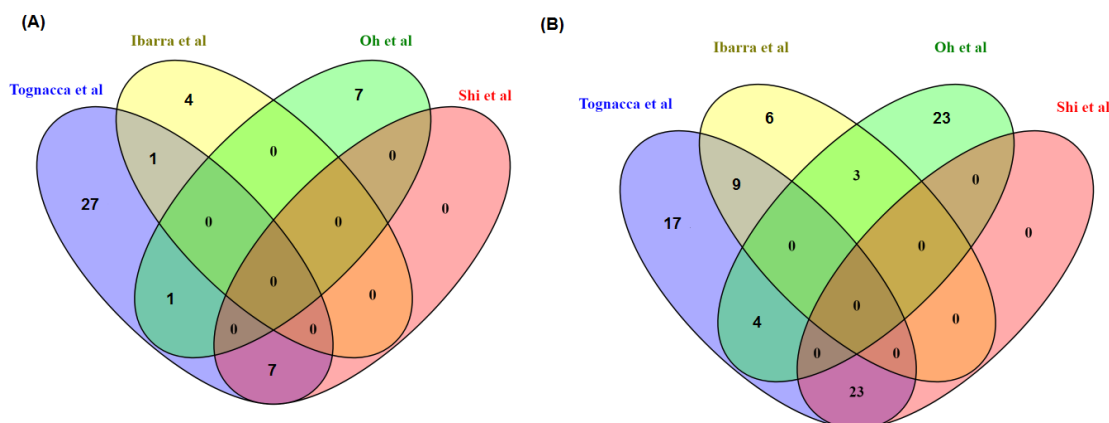


Fig. 3.4.2.2.1. Meta-análisis de transcriptomas asociados a la promoción de la germinación por luz. (A) Diagrama de Venn que compara los genes down-regulados por luz. (B) Diagrama de Venn que compara los genes up-regulados por luz. Los datos de Tognacca et al. aún no han sido publicados y corresponden a esta tesis.

La germinación mediada por luz se encuentra asociada a genes que regulan el metabolismo, señalización y transporte de auxinas. Entre algunos de los genes de metabolismo regulados positivamente en respuesta a la luz encontramos genes como *SUR1*, *SUR2* y *SAV3*. *SUR1* y *SUR2* son regulados positivamente tanto por el phyA y phyB (Fig.3.4.2.2.1. y Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A-B; Ibarra et al., 2013; Shi et al., 2013), mientras que *SAV3* solo es regulado por el phyB (Fig.3.4.2.2.1. y Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A-B; Oh et al., 2009). Se ha documentado que *NIT1* y *CYP79B2* disminuyen sus niveles de expresión sólo en presencia de phyA (Ibarra et al., 2013).

En cuanto a la señalización de las auxinas, los genes *AXR1*, *AXR4*, *RED1* y *ARF18* sólo fueron positivamente regulados por el phyA (Ibarra et al., 2013), mientras que *GH3.6* fue regulado por ambos fitocromos (Fig.3.4.2.2.1. y Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A-B; Ibarra et al., 2013; Shi et al., 2013).

En cuanto al transporte de auxinas, la germinación inducida por el phyA y el phyB promovió positivamente la expresión de tres proteínas de transporte asociados a auxina como *PIN1*, *PIN2* y *PIN7* (Fig.3.4.2.2.1. y Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A-B, Ibarra et al. 2013 y Shi et al. 2013); mientras que *AUX1* fue regulado positivamente por phyB (Fig.3.4.2.2.1. y Tabla Anexo 3.4.2.2.1.A-B; Shi et al 2003). Estos datos apoyan la idea de que el transporte de auxinas es un pre-requisito para la inducción de la germinación por luz y que las vías de señalización de phyA y phyB comparten algunos elementos auxínicos comunes.

3.4.2.3. La germinación inducida por luz altera los niveles de auxinas en las semillas.

Con el objetivo de caracterizar el rol de las auxinas en la germinación, cuantificamos los niveles de auxinas (ácido indol-3-acético, IAA) en semillas salvajes Ler previamente incubadas 72 horas a 5 °C y luego irradiadas con un pulso saturante de luz R o RL, manteniendo un control en oscuridad. Los niveles de las auxinas endógenas se evaluaron a las 0, 5, 12 y 24 horas luego del estímulo de luz. La Figura 3.4.2.3.1.A. muestra los porcentajes de germinación de semillas Ler en función del estímulo lumínico percibido. Se observó que la inducción de la germinación por luz R fue cercana a 95% mientras que la germinación en respuesta al pulso de luz RL o en oscuridad fue 34% y 13%, respectivamente (Fig.3.4.2.3.1.A.). Utilizamos estas semillas para cuantificar los niveles de IAA. Semillas mantenidas en oscuridad y expuestas a un RLp redujeron los niveles de auxinas endógenos en las primeras 5 hs después del pulso de luz manteniendo niveles bajos de auxinas durante el resto del experimento. Por el contrario las semillas irradiadas con un Rp mantuvieron elevados los niveles de auxinas en las primeras 5 hs, para luego alcanzar niveles bajos de auxinas y similares al control a las 12 hs. A partir de las 12 hs, se observó un aumento en los niveles de auxinas triplicándolos con respecto al control a las 24 hs (Fig.3.4.2.3.1.B.). Los resultados de este experimento indican que los niveles de auxinas en semillas que germinan por luz presenta dos fases: un fase temprana de niveles altos de auxinas entre 0-5 hs probablemente asociada a una menor degradación de las auxinas endógenas sintetizadas durante la embriogénesis; y una fase tardía a partir de las 12 hs luego del pulso de luz probablemente asociada a la síntesis *de novo* de la hormona.

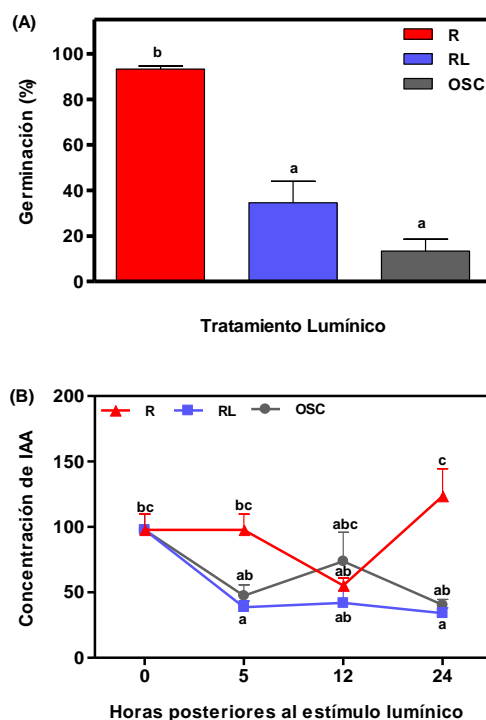


Fig. 3.4.2.3.1. La germinación es inducida por un pulso de luz R en semillas de *Arabidopsis thaliana*. (A) Las semillas fueron irradiadas con un Rp o con un RLp, manteniendo un control en oscuridad. Se evaluó la respuesta a la luz en semillas salvajes Ler embebidas en oscuridad durante 3 días a 5°C, previas al pulso de luz R y RL. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). (B) Cuantificación de los niveles de IAA en semillas. Cada punto representa la media \pm ES (n=6). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de Fisher a $p < 0.05$. Osc: oscuridad; RL: pulso de rojo lejano; R: pulso de rojo.

3.4.2.4. La germinación inducida por luz R es inhibida por auxinas exógenas e involucra procesos de transporte de auxinas.

Para evaluar el desempeño de germinación de las semillas salvajes Col-0, utilizamos distintas concentraciones crecientes de auxinas sintéticas (Picloram) e inhibidores del transporte de auxinas (naptalam, NPA, un inhibidor de transportadores de eflujo auxínico y 1-NOA un inhibidor de transportadores de influjo auxínico) durante todo el período de imbibición de las semillas. La germinación de las semillas fue evaluada utilizando concentraciones crecientes de auxinas e inhibidores del transporte de auxinas adicionadas al medio de incubación. Cuando se evaluó el efecto del NPA, se observó que la germinación de las semillas se redujo un 35% en concentraciones 50 μ M, inhibiéndose completamente en concentraciones iguales y mayores a 100 μ M. La

adición de dosis entre 0 y 10 μM de 1-NOA no tuvo efectos sobre la germinación de las semillas, mientras que concentraciones mayores redujeron la germinación hasta alcanzar valores completos de inhibición con el agregado de 1-NOA 500 μM . La adición de picloram al medio de incubación redujo un 50% la germinación de las semillas entre concentraciones entre 0 y 1 mM y inhibiéndose completamente con dosis más elevadas (Fig.3.4.2.4.1.A.). Los resultados de este experimento sugieren que la promoción de la germinación por luz R requiere del transporte de auxinas y que el agregado exógeno de auxinas reprime la germinación de las semillas.

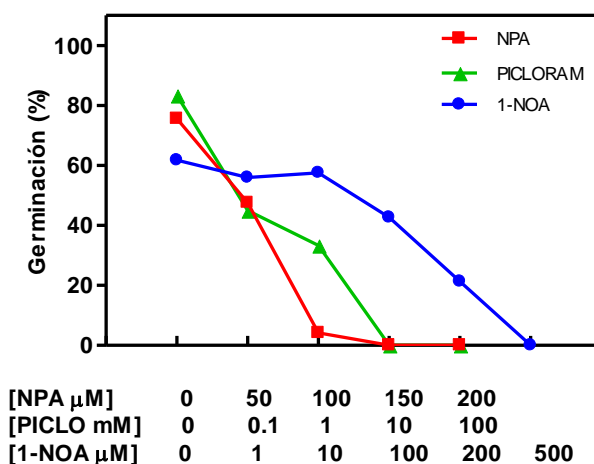


Fig. 3.4.2.4.1. La promoción de la germinación por luz necesita del transporte de auxinas en semillas de *Arabidopsis thaliana*. Se evaluó la respuesta a la luz en semillas salvajes Col-0 embebidas en oscuridad durante 3 días a 5°C, previas al pulso de luz R. Las semillas se incubaron durante todo el período evaluado en presencia de concentraciones crecientes de NPA, 1-NOA y Picloram. Cada punto representa la media \pm ES (n=6). Los valores en la parte inferior del gráfico indican las concentraciones utilizadas para cada uno de los fármacos evaluados.

Adicionalmente, evaluamos los efectos del inhibidor del transporte de auxinas NPA aplicado en el medio de incubación antes y después de irradiar las semillas Col-0 con un Rp. Las semillas fueron embebidas en NPA 200 μM y se estratificaron durante 3 días antes de ser expuestas al Rp. Finalizado este pulso, las semillas se transfirieron a un medio conteniendo agua destilada a diferentes tiempos posteriores al estímulo (72, 77, 96, 102, 120 hs; Fig.3.4.2.4.2.A.). Como controles positivo y negativo, se mantuvieron semillas embebidas en agua (0 hs) o NPA (144 hs) durante todo el experimento (Fig.3.4.2.4.2.A.). Las semillas mantenidas en oscuridad o irradiadas con un RLp no germinaron (Figura Anexo 3.4.2.4.1.). Las semillas salvajes irradiadas con un Rp germinaron ~80% en agua y el NPA aplicado en el medio de incubación durante todo el ensayo inhibió completamente la germinación (Fig.3.4.2.4.2.B., 0 hs y 144 hs,

respectivamente). La aplicación del NPA hasta las 24 hs después del Rp (i.e., 96 hs) no alteró la respuesta de las semillas, pero tiempos mayores de incubación en NPA (i.e., 102 hs y 120 hs) redujeron la germinación al ~20% en semillas Col-0, indicando que el transporte de auxinas es importante en períodos tardíos de germinación (i.e., mayores a 24 hs después del Rp). Adicionalmente evaluamos la importancia funcional de AUX1, PIN3 y PIN7 en esas condiciones experimentales utilizando semillas mutantes de *pin3.3*, *pin3.4*, *pin7.1*, *pin7.2* y *aux1.1*. En todos los casos, las semillas mutantes de transportadores de auxinas fueron más sensibles que Col-0 cuando se aplicó NPA en el medio de incubación. En las semillas mutantes, el tratamiento con NPA a tiempos mayores de 5 hs luego del Rp inhibió significativamente la germinación y alcanzó valores de germinación casi nulos en semillas *pin3.3* cuando el NPA se mantuvo en el medio de incubación durante 24 hs (i.e., 96 hs en la Fig.3.4.2.4.2.B.). Las semillas de los otros alelos mutantes de transportadores de auxinas también germinaron significativamente menos que Col-0 con 24 hs en NPA luego del Rp. Estos datos indican que el transporte de auxinas es necesario para inducir la germinación por luz y que los transportadores PIN3, PIN7 y AUX1 contribuyen a la re-localización de los niveles de auxinas necesarios en esta respuesta.

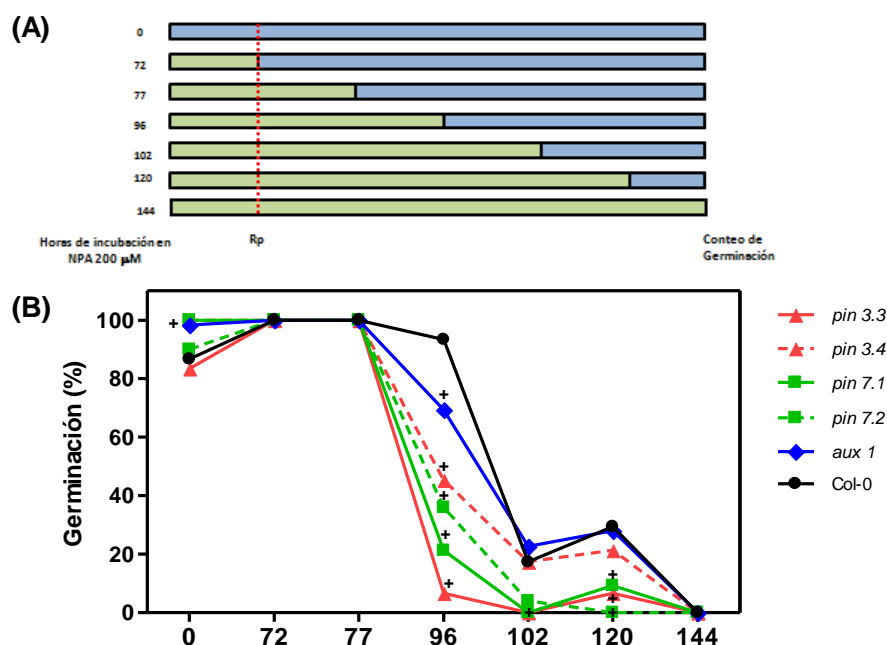


Fig. 3.4.2.4.2. Efecto de la incubación prolongada con NPA sobre la germinación de las semillas. (A) Diagrama del protocolo experimental. Las semillas se incubaron durante 2 horas en oscuridad y luego se irradiaron con un RLp. Luego se incubaron durante 3 días a 5°C y se irradiaron con un Rp. Finalizado el Rp se incubaron durante 3 días a 25°C, momento en el que se contó germinación. Las barras azules representan el período de tiempo de incubación en agua y las barras verdes representan el período de tiempo de incubación en NPA 200 µM. (B) Porcentaje de germinación de las semillas en función a las horas de incubación en NPA 200 µM, que bloquea el transporte de auxinas. El medio de incubación se suplementó con NPA por períodos variables luego de la imbibición de las semillas (0 hs, 72 hs, 77 hs, 96 hs, 102 hs, 120 hs y 144 hs), manteniéndose un control en agua (0 hs) y un control en NPA (144 hs). Cada punto representa la media \pm ES (n=6). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de Fisher a $p < 0.05$. Por claridad en el gráfico, sólo se indican con el símbolo + los genotipos que presentaron diferencias significativas respecto a Col-0.

3.4.2.5. Los transportadores de auxinas PIN3, PIN7 y AUX1 contra-restan los efectos inhibitorios de la germinación por ABA.

Para evaluar si el transporte de auxinas altera la sensibilidad de las semillas al ABA, incubamos semillas salvajes Col-0 y mutantes de los genes *PIN3*, *PIN7* y *AUX1*, en presencia de concentraciones crecientes de ABA. Las semillas Col-0 germinaron a valores máximos en concentraciones entre 0 µM y 0.4 µM de ABA, reduciendo la germinación un 65% cuando se incubaron en dosis de 0.6 µM de ABA. El agregado de ABA 0.8 µM inhibió completamente la germinación de las semillas Col-0. Las semillas

todos los mutantes evaluados mostraron una mayor sensibilidad al ABA respecto a Col-0 entre 0.4 μM y 0.6 μM de ABA (Fig.3.4.2.5.1.). Estos resultados sugieren que el transporte de auxinas a través de PIN3, PIN7 y AUX1 contra-restan los efectos inhibitorios de la germinación por ABA.

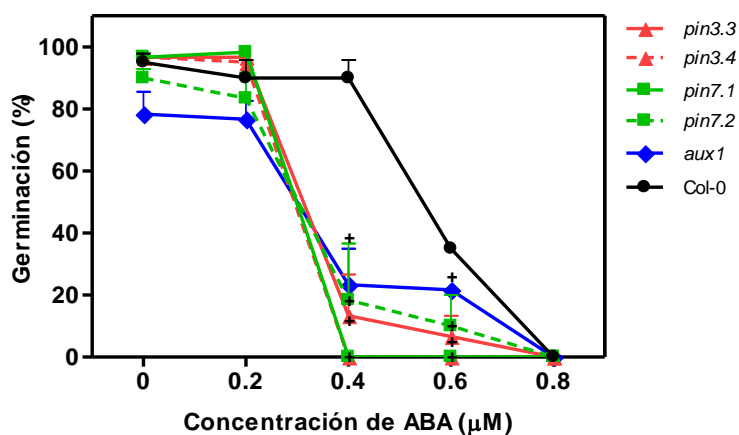


Fig. 3.4.2.5.1. La inhibición de la germinación por ABA es contra-restada en presencia de PIN3, PIN7 y AUX1 en semillas de *Arabidopsis thaliana*. Se evaluó la respuesta al ABA en semillas salvajes Col-0 y mutantes *pin7.1* y *aux1* embebidas en oscuridad durante 3 días a 5°C, previas al pulso de luz R. Cada punto representa la media \pm ES ($n \geq 3$). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Fisher a $p < 0.05$. Por claridad en el gráfico, sólo se indican con el símbolo + los genotipos que presentaron diferencias significativas respecto a Col-0.

3.5. DISCUSIÓN.

El análisis de nuestro transcriptoma arrojó que el 8.50% del total de genes expresados diferencialmente por luz R son factores de transcripción. Entre ellos, *ATHB2* se encuentra entre los primeros 22 genes con mayor nivel de cambio en su expresión. *ATHB2* es regulado tanto por phyA (Ibarra et al., 2013) como por phyB (Fig.3.4.1.1.1. y Fig.3.4.1.1.2.; Oh et al., 2009; Shi et al., 2013) en semillas embebidas de *Arabidopsis*. *ATHB2* es un represor de la germinación: su ausencia acelera la cinética de germinación de las semillas (Fig.3.4.1.2.1.B. y Fig.3.4.1.4.1.) y complementariamente su sobre-expresión disminuye la velocidad de germinación (Fig.3.4.1.2.1.C-D). Además nuestros datos sugieren que *ATHB2* regula los niveles de expresión de *PIL5* ya que la ausencia de *ATHB2* en semillas *athb2-1* reprime la expresión de *PIL5* (Fig.3.4.1.4.2.D.). Estas evidencias sugieren que *ATHB2* podría formar parte de un *loop* de retroalimentación positiva junto con PIF1/PIL5, potenciando los efectos represores de ambas proteínas sobre la germinación (Fig.3.4.1.4.2.D.).

En concordancia con estos resultados, la ausencia de *ATHB2* alteró la sensibilidad de las semillas al ABA (Fig.3.4.1.3.1.) y genes asociados a la red de señalización del ABA como *ABI3*, *ABI5*, *XERICO* y *SOMNUS* tienen disminuida su expresión en el mutante *athb2-1* (Fig.3.4.1.4.2.B-C.). La bibliografía demuestra que *XERICO* promueve la biosíntesis de ABA (Ariizumi et al., 2013), un FT que participa en la señalización del ABA; y *SOMNUS* promueve la expresión de *NCED9* (Iuchi et al., 2001), un gen que sintetiza ABA. Concluimos entonces que *ATHB2* actúa como un regulador negativo de la germinación dependiente de phyB, ejerciendo su función en el metabolismo y la vía de señalización del ABA (Fig.3.5.1.).

En oposición a la señalización del ABA, observamos que *ATHB2* reprime la expresión de *PIN7* en semillas (Fig.3.4.1.4.2.E.) cuya proteína ejercería efectos positivos sobre la elongación celular del eje embrionario en la germinación. No descartamos que otros genes *PIN* (i.e. *PIN1*, *PIN2* y *PIN3*) también sean regulados por *ATHB2* en respuesta a la luz ya que *PIN1*, *PIN2* y *PIN3* son regulados por el phyB a través del módulo de acción HFR1-PIF1/PIL5 en semillas de *Arabidopsis* (Shi et al., 2013). A futuro, sería interesante realizar nuevos experimentos para descifrar el mecanismo de acción de *ATHB2* en el control de la germinación por luz teniendo en consideración los componentes moleculares que están asociados a *ATHB2* y cuya relevancia está documentada en esta tesis.

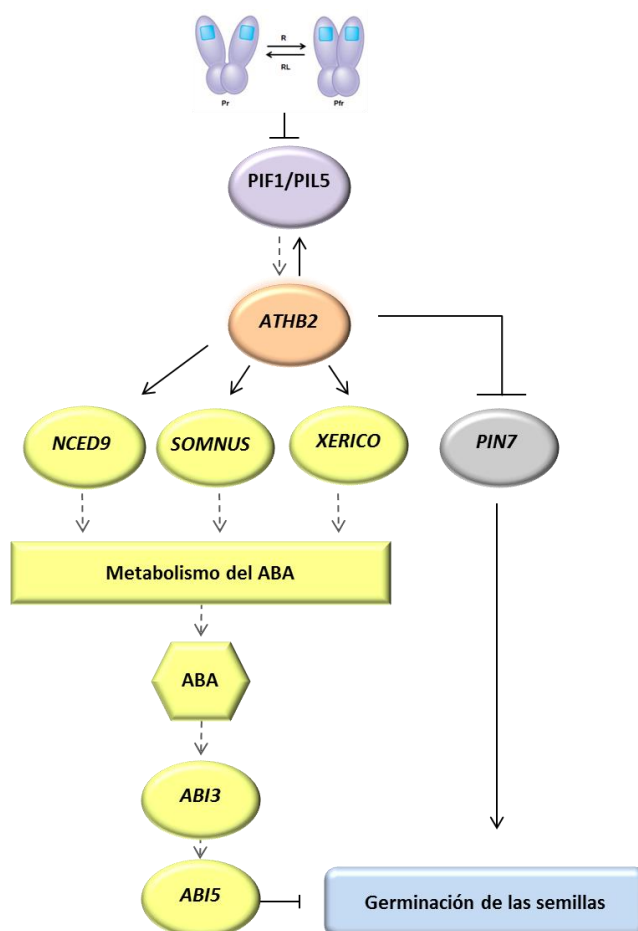


Fig.3.5.1. Modelo de acción propuesto. A la luz, las formas Pfr de PHYA y PHYB entran en el núcleo, se unen a PIF1/PIL5 y activan su degradación. En la actualidad sabemos que PIF1/PIL5 regula de forma directa e indirecta numerosos genes tales como *ATHB2* (Oh et al., 2009). En esta tesis demostramos que *ATHB2* regula así mismo los niveles de expresión de *PIF1/PIL5*. En concordancia con estos resultados, *ATHB2* promueve la expresión de los genes *NCED9*, *SOMNUS* y *XERICO*, tres genes documentados por participar en el metabolismo del ABA (Lefebvre et al., 2006; Kim et al., 2009; Ariizumi et al., 2013). Este aumento en la expresión génica de dichos genes, conduce a niveles hormonales mayores, promoviéndose la ruta de señalización de ABA, modulada por ABI3 y ABI5, cuya expresión génica resultó ser promovida por *ATHB2* en nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, *ATHB2* reprime la expresión génica de *PIN7*, un transportador de eflujo de auxina, cuya proteína ejercería efectos positivos sobre la elongación celular del eje embrionario. Así, *ATHB2* inhibe la germinación de las semillas integrando dos vías hormonales diferentes: regulando negativa y parcialmente el transporte de auxina, y regulando positivamente el metabolismo y señalización del ABA.

Las flechas continuas indican los aportes generados durante esta tesis al modelo de regulación de la germinación por ATHB2. Las flechas discontinuas indican regulaciones de expresión génica previamente documentadas. Los recuadros rectangulares representan procesos biológicos. Los círculos representan genes. El hexágono representa el contenido hormonal.

Los resultados de esta tesis también ponen de relevancia la importancia del transporte de auxinas en la germinación de las semillas de *Arabidopsis*. Demostramos que luz R que promueve la germinación de las semillas mantiene altos los niveles de auxinas activas en una ventana temprana (0 – 5 hs) e incrementa los niveles de auxinas a las 24 hs posteriores al pulso de luz R (Fig. 3.4.2.3.1.). Entre las 5 hs y 12 hs posteriores al Rp se produce una caída de los niveles de auxinas lo que puede estar indicando que las auxinas endógenas de la fase temprana son las presentes en las semillas maduras en la planta madre y que los niveles de auxinas alcanzados en la fase tardía son el resultado de procesos “*de novo*” que ocurren posteriores a la imbibición de las semillas. En nuestras condiciones experimentales cuando las semillas son embebidas en agua, la germinación de las semillas se completa a las 36 hs posteriores a la imbibición (Figura Anexo 3.5.2.), sugiriendo que el aumento de las auxinas 24 hs posteriores al Rp es necesario para promover la elongación del eje embrionario que conduce a la protrusión de la radícula cuando atraviesa la micropila seminal unas horas más tarde. Las auxinas también promueven la germinación en semillas de otras especies. Guan & Scandalios (2002) observaron que la germinación de embriones de maíz es promovida por auxinas que inducen la expresión de catalasa. Por otra parte, se ha observado un incremento de auxina activa que coincide con el crecimiento celular de los embriones de pino silvestre durante la imbibición (Ljung et al., 2001).

Los resultados de esta tesis sugieren además que el transporte de auxinas es relevante para inducir la germinación por luz (Fig.3.4.2.1.1.; Fig.3.4.2.4.1. y Fig.3.4.2.4.2.). Es probable que el transporte de auxinas ayude a mantener niveles homeostáticos de auxinas en los tejidos necesarios para que la germinación pueda ocurrir. Algunas evidencias de esta tesis van en esa dirección: (a) inhibidores del influjo (1-NOA) y eflujo de auxinas (NPA) de las células inhiben la germinación de las semillas como lo hace el agregado de auxinas sintéticas (Picloram) en el medio de incubación (Fig.3.4.2.4.1.) y (b) la germinación inducida por luz R es inhibida en semillas mutantes de PIN3, PIN7 y AUX1 demostrando que estos transportadores del eflujo e influjo de auxinas, respectivamente, son necesarios para promover la germinación (Fig.3.4.2.4.2.). Proponemos que la luz promovería la expresión de *PIN3*, *PIN7* y *AUX1* cuyas proteínas se re-localizarían en las células epidérmicas de la zona de elongación del eje embrionario aumentando el transporte de auxinas y consecuentemente los niveles de auxinas hacia el tip de la radícula del embrión, promoviendo la elongación celular y posterior ruptura del endosperma. La germinación ocurriría a través de la acción combinada del ablandamiento del endosperma y la presión que se ejerce durante la elongación del eje embrionario. Un mecanismo similar de acción ha sido propuesto para PIN3 en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a condiciones de sombreado. La señal de sombreado de baja relación de luz R:RL modula la distribución de auxinas en los hipocotilos a través de la relocalización de PIN3 en los tejidos, y esta respuesta aumenta la habilidad competitiva de las plantas que crecen bajo densos canopeos (Keuskamp et al., 2010).

La germinación inducida por luz es consecuencia de la integración de redes de señalización de distintas hormonas (Fig.3.4.2.5.1.), como ocurre en otros procesos del desarrollo como la de-etiolación de la plántulas, las respuestas de escape al sombreado y el reloj endógeno (Alabadi & Blazquez, 2009). En esta tesis demostramos que la inhibición de la germinación por ABA es contra-restada en presencia de los transportadores PIN3, PIN7 y AUX1 (Fig.3.4.2.5.1.) sugiriendo que la luz promueve la germinación de las semillas de *Arabidopsis* a través de la integración de señales

moleculares asociadas al ABA y a las auxinas. Otros investigadores han documentado que la acción de las auxinas y el ABA puede ser interdependiente en la germinación de semillas de *Arabidopsis* mutantes de la señalización de auxinas y líneas transgénicas sobre-expresantes de un micro ARN (MIR160) que altera la señalización de las auxinas (Liu et al., 2007). Semillas mutantes *arf10* son hipersensibles al ABA y la sobre-expresión de MIR160 contra-resta los efectos inhibitorios del ABA sugiriendo que la regulación negativa de ARF10 por miR160 afecta la respuesta al ABA de las semillas (Liu et al 2007). Concluimos entonces que las auxinas son hormonas relevantes en el proceso de germinación mediado por luz y su acción involucra mecanismos asociados a su transporte.

Resulta interesante profundizar también sobre el modo en que se establece la interacción entre los transportadores aquí mencionados y elementos de la vía de señalización por ABA, particularmente *ATHB2*, dado que demostramos que la inhibición de la germinación por ABA es contra-restada en presencia de los transportadores PIN3, PIN7 y AUX1 (Fig.3.4.2.5.1.) y que *ATHB2* reprime la expresión de PIN7 (Fig.3.4.1.4.2.E.).

3.6. CONCLUSIONES.

Los resultados expuestos en este capítulo demuestran que en semillas de *Arabidopsis thaliana*: (1) El factor de transcripción *ATHB2* reprime la germinación de las semillas en luz blanca a través de la vía de señalización del ABA. (2) La germinación inducida por luz R modifica los niveles de auxinas en las semillas e involucra procesos de transporte de auxinas mediados por PIN3, PIN7 y AUX1, al menos parcialmente, que pueden contra-restar los efectos inhibitorios del ABA.

CAPÍTULO 4.

INTEGRACION DE SEÑALES LUMÍNICAS Y TÉRMICAS EN LAS SEMILLAS: ROL DEL RELOJ CIRCADIANO.

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo:

Arana MV, Tognacca RS*, Estravis-Barcalá M, Sánchez RA, Botto JF. 2017. Physiological and molecular mechanisms underlying the integration of light and temperature cues in Arabidopsis thaliana seeds. Plant Cell Environ. <https://doi.org/10.1111/pce.13076>.*

*Ambos autores contribuyeron de igual manera.

4.1. INTRODUCCIÓN.

La dormición de las semillas juega un rol central en el ajuste de las poblaciones al medio ambiente que las rodea. Diferentes procesos que modulan los niveles de dormición y su ruptura definen el tiempo de germinación de la población de semillas y son, en consecuencia, de mayor importancia adaptativa (Donohue et al., 2005). Durante su desarrollo en la planta madre, las semillas de muchas especies son capaces de adquirir su estado de dormición. Luego de que las semillas son dispersadas y caen en el suelo, pueden presentar cambios cíclicos en su sensibilidad a diferentes señales ambientales durante el tiempo que permanecen enterradas en el suelo (Bouwmeester et al., 1994; Derkx & Karssen, 1994). *DOG1* ha sido caracterizado como un gen que impone dormición en las semillas y cuyos niveles de proteínas se acumulan durante la maduración. Más aún, su abundancia en semillas frescas recién cosechadas determina el nivel de dormición que presentarán las mismas (Graeber et al., 2014). Así, bajos niveles de dormición están relacionados con la inactivación de la proteína *DOG1*, cuya expresión varía a lo largo del año en semillas de *Arabidopsis* enterradas en el suelo, acompañando variaciones de los ciclos de dormición (Footitt et al., 2013). Adicionalmente, los niveles de expresión de genes vinculados a las vías del ABA y las GAs también cambian en consonancia con dichas variaciones (Footitt et al., 2011).

Cuando el nivel de dormición es lo suficientemente bajo, la germinación puede ser inducida en respuesta a señales ambientales que permiten predecir que las condiciones son las adecuadas para establecimiento y desarrollo de la futura plántula. Entre las señales ambientales más importantes que promueven la ruptura de la dormición encontramos a la luz, las temperaturas alternadas y los nitratos (Benech-Arnold et al., 2002). De ellas, la luz es el factor más conocido y mejor caracterizado. En numerosas especies se ha demostrado que las temperaturas alternadas actúan como una señal efectiva que provee a las semillas información sobre la profundidad del suelo a la que se encuentran y la cobertura del suelo que las rodea (Benech-Arnold et al., 1988; Ghera et al., 1992). Aunque existen algunas especies que sólo requieren de temperaturas alternadas para romper la dormición e iniciar la germinación, otras necesitan no sólo las temperaturas alternadas sino también la luz (Baskin & Baskin, 1998).

En este sentido, la luz R y RL es percibida por los fitocromos, que son sintetizados en su forma biológicamente inactiva Pr y al absorber luz se convierten a la forma biológicamente activa Pfr. En *Arabidopsis* existen 5 fitocromos, llamados PHYA-PHYE. phyB es el principal fotorreceptor que media las respuestas del tipo R:RL reversibles durante la germinación (Shinomura et al., 1994; Botto et al., 1995), mientras que phyE contribuye en esta regulación en semillas doble mutantes *phyAphyB* (Henning et al., 2002), sugiriendo la existencia de una redundancia en las funciones de los fitocromos durante el control de la germinación por luz R. En algunas condiciones, el phyA es el principal fotorreceptor involucrado en la promoción de la germinación por luz RL (Botto et al., 1996; Shinomura et al., 1996), y phyE y phyD pueden contribuir a esta respuesta en ausencia de phyA (Henning et al., 2002; Arana et al., 2014).

La interacción de los fitocromos con el factor de transcripción PIF1/PIL5 induce cambios en los patrones de expresión génica en diferentes tejidos de las semillas, influyendo directa o indirectamente sobre el metabolismo o la sensibilidad a hormonas y

proteínas que forman parte de las paredes celulares (Oh et al., 2004, 2007). La promoción de la germinación depende de los cambios que se producen en los niveles hormonales, principalmente en los de ABA y GA. Así, la terminación de la dormición y la inducción de la germinación requieren altos niveles de GA y bajos niveles de ABA; más aún, la disminución de los niveles de PIF1/PIL5 produce cambios en la expresión génica, lo que lleva a un aumento en la relación GA:ABA. A pesar de la importancia que tienen las temperaturas alternadas en la ruptura de la dormición, hay poca información acerca de la acción que ejerce esta señal en la expresión génica de los genes vinculados a las vías del ABA y las GAs. En este sentido, se ha demostrado que las temperaturas alternadas aumentan la relación de los niveles GA:ABA en semillas de *Cynara cardunculus* disminuyendo el contenido y la sensibilidad al ABA y reduciendo la expresión de *NCED* y *ABI5* (Huarte et al., 2014). Foley et al. (2010) realizaron un transcriptoma de semillas de *Euphorbia esula* y demostraron que la percepción de las temperaturas alternadas provoca una disminución en la expresión de genes vinculados a las vías del ABA, incluyendo a *ABI5*. En otros casos, las temperaturas alternadas son necesarias para la promoción del metabolismo de las GAs, lo que conlleva un aumento en los niveles de expresión de *GA3ox1* (Arana et al., 2007).

Algunas de las señales ambientales que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas se relacionan fuertemente con componentes del reloj circadiano. Este reloj puede ser modulado por luz, temperatura y nitratos (Gutierrez et al., 2008). El funcionamiento del reloj también altera el metabolismo hormonal (Imaizumi, 2010). En consecuencia, el reloj circadiano podría estar involucrado en el control de la dormición de las semillas. Se ha propuesto que los genes *CCA1*, *GI* y *TOC1* están involucrados en la ruptura de la dormición en respuesta a señales ambientales en semillas de *Arabidopsis* (Penfield & Hall, 2009). En este capítulo extendemos el conocimiento de la implicancia de los genes del reloj en el control de la germinación mostrando su asociación con las temperaturas alternadas, exponiendo previamente a las semillas a la luz.

4.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Objetivo particular:

Sabiendo que (1) la luz y la temperatura modulan la germinación en *Arabidopsis thaliana*, (2) los ciclos diarios de luz y/o temperatura influyen en el funcionamiento del reloj circadiano y (3) que los componentes del reloj circadiano influyen en la respuesta a la temperatura durante la germinación, el objetivo de este capítulo es el de estudiar los efectos de las temperaturas alternadas en la inducción de la germinación por luz y evaluar los genes del reloj circadiano que son relevantes en la respuesta.

Hipótesis asociadas:

1. La exposición a temperaturas alternadas influye en la expresión de genes del reloj circadiano en semillas y esto se encuentra asociado a cambios en la sensibilidad a la luz roja en la promoción de la germinación.
2. La proteína DOG1 participa en la señalización para la integración de señales térmicas y lumínicas y afecta la expresión de los genes del reloj circadiano.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.3.A. Condiciones de cultivo de las plantas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) transparentes conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada y se incubaron a 5°C durante 7 días. Transcurrido ese período, se les dio un pulso saturante de R de 2 horas, volviendo luego a oscuridad por 24 horas a 25°C. Finalmente, se expusieron a luz blanca para promover su crecimiento y ser luego trasplantadas en recipientes plásticos de 110 cm³ con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (proporción 2:2:1). Las plantas fueron regadas durante su ciclo de vida con una solución nutritiva de Hakaphos (13-40-13+MgO+M.E). Las plantas fueron cultivadas en luz blanca 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiancia (tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54) con temperaturas que oscilaron entre 21°C \pm 2°C, hasta el momento de la cosecha. Las semillas fueron cosechadas en el momento en que todas las silicuas estuvieran completamente secas en grupos consistentes en 10 plantas por genotipo. Las semillas se utilizaron inmediatamente para los experimentos o fueron almacenadas en tubos abiertos dentro de un recipiente hermético provisto con sílica gel a temperatura constante de 4°C y oscuridad. En este último caso se utilizaron en un plazo de alrededor de los 10 días post cosecha.

4.3.B. Genotipos utilizados en los ensayos fisiológicos y moleculares.

Se utilizaron las siguientes líneas mutantes y transgénicas: (a) Genotipos salvajes: Col-0, Ler y CVI; (b) Mutantes de fitocromos: *phyA-211* (Salk_014575C), *phyB-9* (Salk_069700), *phyA-211/phyB9* (Reed et al., 1994); (c) Mutantes de reloj: *prp7-3* (Salk_030430), *toc1-1* (CS 3756), *cca1-1* (CS 67781) y *cca1-1/lhy-21*; (d) Mutantes de germinación: DOG1-OX, NILDOG17-1, *nildog1*, *dog1* (Salk_000867) y *ProDOG1:3xHA:DOG1*. Las líneas *cca1-1* y *cca1-1/lhy-21* (Green et al., 1999) fueron gentilmente cedidas por el laboratorio de la Dra. Green (Department of Plant Sciences, Institute for Life Sciences, Edmund Safra Campus, Givat Ram, 91904, Jerusalem, Israel). Las líneas *dog1*, DOG1-OX, NILDOG17-1 y *nildog1* fueron cedidas gentilmente por la Dra. Leónie Bentsink. La línea *ProDOG1:3xHA:DOG1* (Nakabayashi et al., 2012) fue cedida gentilmente por el laboratorio del Dr. Wim Soppe (Department of Plant Breeding and Genetics, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, 50829 Cologne, Germany). El resto de las líneas utilizadas fueron obtenidas del ABRC (www.arabopsis.org).

4.3.C. Diseño experimental y ensayos fisiológicos de germinación.

Se sembraron réplicas biológicas de 20 semillas por genotipo cada una en placas de petri cada una conteniendo 25 mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas embebidas por 1 hora en oscuridad se irradiaron con un pulso saturante de RL (estableciendo una relación de Pfr/P de 0.03, 42 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las placas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron durante 48 horas en dos condiciones de temperaturas (tratamientos de pre-incubación): (a) temperaturas alternadas (16h 15°C/8h 23°C) y (b) temperaturas constantes (17.5°C, 23°C ó 15°C). Luego de las 48 horas de incubación se irradiaron con un pulso de 3

minutos de R (estableciendo una relación de Pfr/P de 0.87, $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) o RL. Transcurrido el pulso de luz, las placas se envolvieron nuevamente con las bolsas y se incubaron a 17.5°C por 5 días antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la aparición de la radícula a simple vista.

4.3.D. Evaluación de los niveles de transcriptos en semillas.

4.3.D.1. Diseño experimental y extracción de las muestras utilizadas: se trataron grupos de semillas de cada genotipo (5 a 10 mg) como se mencionó en el punto 3C. Los tratamientos utilizados fueron los de temperaturas alternadas y temperatura constante de 17.5°C . Las muestras se tomaron a ZT = 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas. Llamamos ZT al período de incubación de las semillas en oscuridad a 17.5°C al final de los tratamientos de pre-incubación. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces utilizando diferentes lotes de semillas.

4.3.D.2. Extracción y cuantificación del ARN: se realizó la extracción del ARN de las muestras para cada condición de temperatura. Luego de la cosecha de las muestras en nitrógeno líquido, las mismas se almacenaron a -80°C hasta proceder a la extracción del ARN. El ARN total de semillas fue extraído utilizando el kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN fue eluído en un volúmen final de elución de $50 \mu\text{L}$.

Se determinaron la calidad y concentración ARN mediante espectrofotometría y gel de agarosa. Para cuantificar el ARN mediante espectrofotometría se utilizaron $2 \mu\text{L}$ de muestra diluida en $398 \mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos presentan su máximo de absorción a 260 nm y que las proteínas lo hacen a 280 nm , se evaluó la relación de absorbancias en estas dos longitudes de onda para determinar la pureza del material genético (relación 260/280). Una relación óptima de trabajo ronda el valor de 1.8. Se procedió luego a la determinación de la calidad del ARN mediante la corrida en un gel de agarosa 2% con Bromuro de Etidio con el fin de descartar la posible presencia de ADN en la muestra o bien de ARN degradado.

4.3.D.3. Síntesis del ADN copia a partir del ARN obtenido: una vez obtenido el ARN, se procedió a realizar el tratamiento de las muestras con DNasa (para evitar la posible interferencia de ADN contaminante en el ARN obtenido), empleando la enzima RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, Madison, USA). Se utilizó como material de partida 1 µg de ese ARN y se sintetizó el ADN copia utilizando la enzima MMLV High Performance Reverse Transcriptase (Epicentre, Madison, USA), según el siguiente protocolo: se trató 1 µg de ARN total con una mix de 2µL de DNasa + 1 µL de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega, Madison, USA). Esta solución fue incubada durante de 30 minutos a 37°C. Luego se añadió con 1 µL de Stop Solution (Promega, Madison, USA) y se incubó durante 10 minutos a 65°C para inactivar la DNasa. A continuación se agregaron 2 µL de oligodT 100 mM y se incubó durante 2 minutos a 65°C para luego incubar esta solución durante 1 minuto en hielo. Finalmente se adicionaron 6,5 µL de la mix de RT (2 µL de MMLV HP RT 10X Reaction Buffer + 2 µL de DTT 100 mM + 1 µL de dNTPs mix 10 mM + 1.5 µL de H₂O_{mq}) y 0.5 µL de MMLV High Performance Reverse Transcriptase Enzyme (200 U/µl), obteniendo un volumen final de reacción de 20 µL. Esta solución se incubó durante 1 hora a 37°C, 5 minutos a 85°C y 1 minuto en hielo.

4.3.D.4. Análisis de expresión génica: una vez obtenido el ADN copia se procedió a la medición de los genes candidatos mediante la técnica de Real Time PCR. La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo, en un volumen final de reacción de 10 µL: se preparó una solución mix de 5 µL de FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche, Madison, USA) + 1 µL de primer mix forward más reverse 5 µM + 3 µL de H₂O_{mq} + 1 µL ADNc por reacción. La amplificación se realizó utilizando el siguiente programa: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C más 1 min a T_m. Dado que el SYBR Green produce fluorescencia al unirse a moléculas de ADN doble cadena, pero de manera inespecífica a la secuencia, parte de la fluorescencia emitida puede corresponder a productos de amplificación inespecífica, o a dimerizaciones entre primers. Para verificar que el total de la fluorescencia emitida corresponde al producto de amplificación esperado, luego de la amplificación se realizó una reacción de disociación, mediante la cual se obtiene el valor de la temperatura de disociación del amplicón. La reacción de disociación se llevó a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a T_m y 15 segundos a 95°C. La reacción de PCR y la cuantificación de la fluorescencia fueron realizadas con el equipo 7500 Real Time PCR System cyler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los datos de expresión de los genes de cada muestra fueron relativizados al nivel de expresión del gen PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A) (Czechowski et al. 2005). Las secuencias de los primers utilizados se encuentran en la Tabla 4.4.2.1.

4.3.D.5. Análisis estadísticos: para evaluar diferencias significativas en la respuesta de las semillas a los diferentes tratamientos de temperatura, se realizó un análisis de la varianza de dos factores (ANOVA), utilizando previamente la transformación angular del porcentaje de germinación. Para ello se utilizó el software GraphPad Prism Software versión 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se consideró que la pérdida de función de los fitocromos o de los componentes del oscilador central del reloj circadiano causó una alteración significativa en la germinación mediada por temperatura cuando la interacción tratamiento-genotipo del ANOVA fuera significativa (P<0.05). Para evaluar las diferencias entre genotipos, se realizó el post test de Bonferroni.

4.3.E. Evaluación de los niveles de proteína DOG1.

4.3.E.1. Diseño experimental y extracción de las muestras utilizadas: se sembraron 3 muestras biológicas de semillas Col-0 y ProDOG1:3xHA:DOG1 (10 a 15 mg cada una) para cada condición de temperatura sobre papel de filtro embebido en agar-agua 0,8 % (p/V). El protocolo experimental fue igual al mencionado en el punto 3.C., pero luego de las 48 horas de temperaturas alternadas y constante, se procedió a la cosecha de las muestras (ZT_0). Se cosecharon además muestras control (1 hora de imbibición en oscuridad, previas al RLp inicial) para establecer los niveles iniciales de proteína DOG1 previos a los tratamientos de temperatura. Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la extracción proteica.

4.3.E.2. Extracción y cuantificación proteica en las muestras biológicas: para la extracción proteica se utilizaron 200 µL de buffer de extracción por muestra biológica. El buffer de extracción se preparó de la siguiente manera: Tris-HCl 50 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, Glicerol 10%, EDTA 10 mM pH=8, Sarcosyl 0.1%, β-mercaptoetanol 10 mM y PMSF 1 mM (Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Cat. N° 04 693 116 001 – Roche, Madison, USA). Se machacaron las muestras con nitrógeno líquido y se les adicionó 200 µL de buffer de extracción. Luego se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, descartándose el pellet y almacenando las muestras en hielo para proceder luego a la cuantificación por Bradford (Bradford, 1976).

Para la cuantificación proteica se utilizó el método de Bradford (Bio-Rad) (Bradford, 1976). El reactivo de Bradford 2X se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G/250 en 50 mL de etanol 95% y 100 mL 85% m/v de ácido fosfórico y se llevó a volumen con agua. Luego se procedió a su filtrado.

Para estimar las concentraciones de proteína en cada una de las muestras biológicas, se realizó primero una curva estándar de BSA por duplicado, de concentraciones que variaron entre 0 µg y 10 µg, utilizando un volumen final de 1 mL. Para cada punto se utilizaron 200 µL de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a 620 nm para cada uno de los puntos de la curva estándar de BSA. Luego se midieron las absorbancias en cada una de las muestras, utilizando 200 µL de reactivo de Bradford, 5 µL de muestra y 795 µL de H₂O. Finalmente se procedió a la relativización de estos valores con los de la curva estándar para obtener la concentración de proteína en cada muestra.

4.3.E.3. Medición de los niveles de proteína DOG1 por SDS-PAGE: el blot de proteínas se realizó mediante la técnica SDS-PAGE. Se sembraron 35 µg de proteína en un gel de SDS poliacrilamida 12% para la corrida electroforética. Junto con las muestras se corrió el marcador de peso molecular SeeBlue Plus 2-Prestained (Invitrogen, Madison, USA). Se procedió a la corrida electroforética a 100V. Luego de la corrida se procedió a realizar la transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa (AmershamTM ProtanTM Premium 0.45 µm. GE Healthcare) mediante electrotransferencia (1 hora en frío a 100V). Transcurrido ese tiempo se procedió al lavado de la membrana con buffer PBS-T (Buffer Fosfato Salino con Tween-20) e incubación con Rojo Ponceau durante 20 minutos. Luego de los 20 minutos se lavó la membrana con PBS-T y se procedió al bloqueo de la misma durante 45 minutos a T° ambiente y agitación y luego overnight a 4°C (el buffer de bloqueo consistió en 3 gr de

leche en polvo descremada en 30 mL de PBS-T). Se procedió al lavado con PBS-T y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (Anti-HA 12CA5, Roche, Madison, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación (dilución del anticuerpo: 5 mL de solución 1% buffer de bloqueo, relación 1:1000 buffer:anticuerpo). Se realizaron luego dos lavados con PBS-T de 5 min cada uno y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (Goat anti-mouse IGG (H+L) 1mg de Invitrogen, Madison, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación (dilución del anticuerpo: 5 mL de solución 1% buffer de bloqueo, relación 1:5000 buffer:anticuerpo). Finalmente se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS-T.

La detección de las bandas se realizó utilizando 600 μ L de ECL en una relación 300 μ L SN A + 300 μ L SN B (Amersham ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent – GE Healthcare) y placas de quimioluminiscencia (Amersham HyperfilmTM - GE Healthcare), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

4.3.E.4. Cuantificación de los niveles de proteína DOG1. Relativización a Ponceau: la intensidad de las bandas detectadas se cuantificó utilizando el software ImageJ. Para ello se procedió a realizar una relativización a las bandas detectadas mediante la tinción con Rojo Ponceau, según el protocolo descrito en Sellaro et al., 2009. Los resultados se normalizaron al tratamiento control (1 hora de imbibición en oscuridad, previas al RLp).

4.3.E.5. Análisis estadísticos: para evaluar diferencias significativas de niveles de proteína DOG1, se realizó un ANOVA de un factor seguido de un test de Bonferroni. Se utilizó el software GraphPad Prism Software versión 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

4.4. RESULTADOS.

4.4.1. Efecto de los ciclos diarios de temperatura sobre la germinación de semillas *Arabidopsis thaliana*.

Con el objetivo de evaluar el rol de los ciclos diarios de temperatura sobre la promoción de la germinación por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*, evaluamos la respuesta de germinación de semillas Col-0 a diferentes temperaturas de incubación. Para ello, las semillas fueron incubadas durante 1 hora en oscuridad antes de la irradiación con un RLp. Luego fueron expuestas durante dos días a diferentes condiciones de temperaturas. Los regímenes térmicos que se establecieron fueron: temperaturas alternadas de 15°C/23°C por 16h/8h (simulando condiciones en el campo) y, temperaturas constantes a 15°C, 23°C y 17.5°C. Luego fueron irradiadas con Rp o RLp. Se contó germinación a los 5 días posteriores de incubación a 17.5°C (Fig.4.4.1.1.A.).

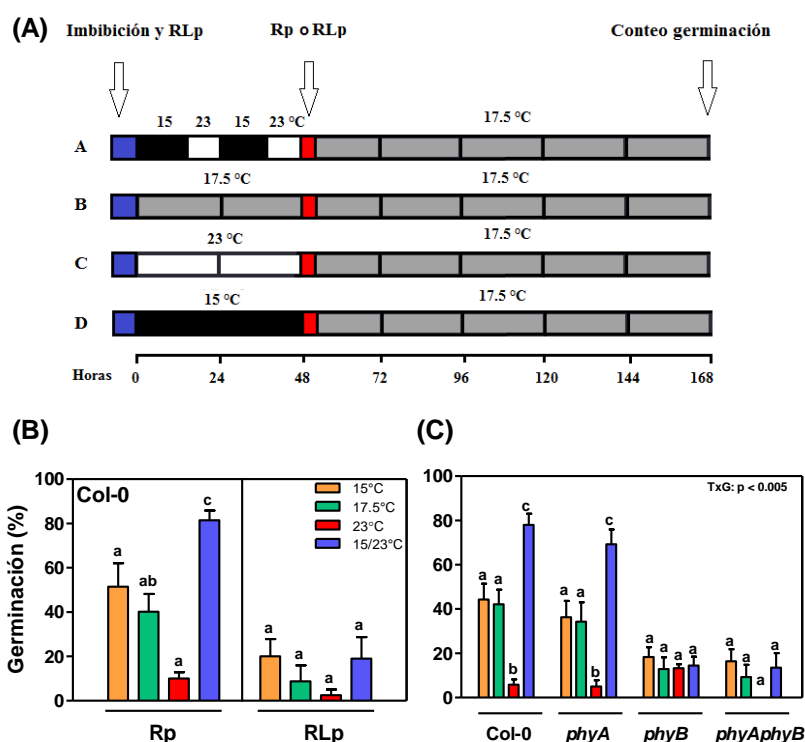


Fig. 4.4.1.1. Los ciclos diarios de temperatura promueven la germinación de las semillas en respuesta a la luz R a través de la acción exclusiva del phyB. (A) Protocolo experimental utilizado para evaluar la promoción de la germinación por luz y temperatura. (B) Germinación de semillas salvajes Col-0 embebidas en oscuridad a 15°C, 17.5°C, 23°C y 15°C/23°C, previas al Rp. Se muestra un control de luz RL (las semillas incubadas en completa oscuridad germinaron menos del 2%). (C) Germinación inducida por luz R en semillas Col-0, *phyA*, *phyB* y *phyAphyB* incubadas durante dos días en las 4 condiciones térmicas indicadas en (A). Cada barra representa la media \pm ES ($n \geq 6$). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA seguido de test de Bonferroni. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias a $p < 0.05$. (Datos obtenidos con la colaboración de Maximiliano Estravis-Barcala & Verónica Arana).

La Figura 4.4.1.1.B. muestra los porcentajes de germinación de semillas Col-0 en función de las temperaturas de incubación. Los valores de porcentaje de germinación de cada tratamiento térmico fueron transformados mediante transformación angular para la evaluación estadística. La comparación de medias se realizó mediante análisis de ANOVA seguido por test de Bonferroni ($p < 0.05$).

Se observó que las temperaturas alternadas promovieron significativamente la germinación con respecto al tratamiento de temperaturas constantes. El Rp promovió la germinación de las semillas por encima de 80% en respuesta a la alternancia 15°/23°C, mientras que la germinación en respuesta a incubación a temperaturas constantes fue menor: 51%, 40% y 10% a 15°C, 17.5° y 23°C, respectivamente. Se mantuvo además un control de luz RL y oscuridad, en donde no se observaron diferencias significativas en los niveles de germinación de semillas expuestas a temperaturas constantes vs

temperatura alternada (Fig.4.4.1.1.B). Los resultados de este experimento demuestran que, en nuestras condiciones experimentales, tanto la luz R como los ciclos diarios de temperaturas promueven significativamente la germinación en las semillas Col-0.

Dado que la germinación inducida por luz R puede ser mediada por la acción de diferentes fitocromos (Botto et al., 1996; Henning et al., 2003; Arana et al., 2014), se evaluó la respuesta a la luz y a los ciclos diarios de temperaturas de mutantes nulos simples y dobles de *phyA* y *phyB*, manteniendo a Col-0 como el genotipo control (Fig.4.4.1.1.C). Las semillas de los genotipos Col-0 y *phyA* germinaron cerca del 80% en respuesta a ciclos diarios de temperatura y menos del 50% a temperaturas constantes, mientras que las semillas *phyB* y *phyAphyB* germinaron por debajo del 20% independientemente del tratamiento de temperatura (Fig.4.4.1.1.C). Los resultados de estos experimentos indican que los ciclos diarios de temperatura promueven la germinación de las semillas en respuesta a la luz R y esta respuesta está mediada exclusivamente por el fitocromo B.

4.4.2. Relación entre ciclos diarios de temperatura y genes de la germinación en semillas Col-0.

Con el objeto de tener una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la germinación inducida por luz y temperatura, se analizó la expresión de genes vinculados a las vías de las GA, del ABA y del crecimiento celular. Se extrajo ARN de semillas Col-0 mantenidas en oscuridad a temperaturas alternadas (15/23°C) o constante (17.5°C). La cosecha del material se realizó al finalizar los tratamientos térmicos a (ZT_0). Con dicho material se realizaron los qRT-PCR correspondientes para cada gen.

Se evaluó la expresión de (a) el receptor de GA (*GID1A*) y (b) dos genes de la síntesis de GA activa como *GA3_{ox1}* y *GA20_{ox3}* (Yamauchi et al., 2004). En la Fig. 4.4.2.1. se puede observar que todos los genes presentaron el mismo patrón de expresión: los ciclos diarios de temperatura de 15°C/23°C promovieron significativamente la expresión de dichos genes en comparación con la temperatura constante de 17.5°C. Las temperaturas alternadas promovieron entre 3.8 a 8.3 veces más la expresión de los genes que promueven la síntesis de GA activas (Fig.4.4.2.1.B. y Fig.4.4.2.1.C., respectivamente) y 35.5 veces más la expresión del receptor *GID1A* (Fig.4.4.2.1.A).

Se han establecido fuertes correlaciones entre la expresión de genes que codifican para expansinas y el crecimiento celular. Esto sugiere que dichas proteínas serían un punto de control endógeno para el crecimiento celular (Cosgrove, 2000). Se demostró además que las expansinas son necesarias para que la germinación ocurra. Se evaluó entonces la expresión de un gen de pared celular: *EXP10*, previamente documentado en la germinación de semillas inducida por luz (Ibarra et al., 2013), observándose que los ciclos diarios de temperatura indujeron significativamente más de 130 veces la expresión de este gen (Fig.4.4.2.1.A.).

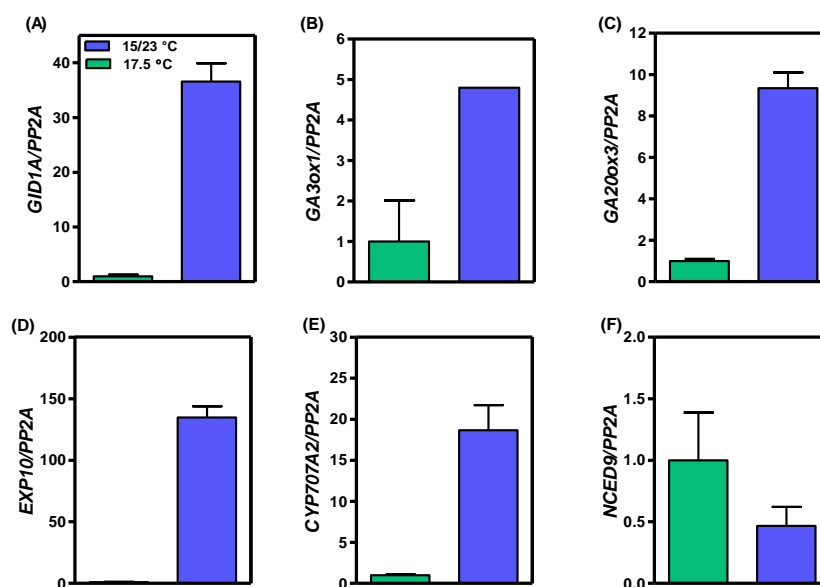


Fig. 4.4.2.1. Los ciclos diarios de temperatura promueven la expresión de genes involucrados en el metabolismo del ABA y las GA. Expresión de (A-C) genes del metabolismo de GA (*GID1A*, *GA3ox1* y *GA20ox3*), (D) un gen de pared celular (*EXP10*) y (E-F) genes del metabolismo del ABA (*CYP707A2* y *NCED9*) en respuesta a ciclos diarios de temperatura (15/23°C) o temperatura constante (17.5°C) en semillas Col-0. Cada barra representa la media \pm SD.

Se evaluaron además genes involucrados en el metabolismo del ABA: *CYP707A2* y *NCED9* (Lefebvre et al., 2006) observándose que la expresión del gen *NCED9*, un gen necesario para sintetizar ABA activo en las semillas, se redujo significativamente a la mitad en respuesta a ciclos diarios de temperaturas (Fig.4.4.2.1.F.), mientras que *CYP707A2*, un gen involucrado en las vías catabólicas del ABA, incrementó su expresión significativamente más de 17 veces con respecto al tratamiento de temperaturas constantes (Fig.4.4.2.1.E.). Los resultados de estos experimentos indican que los ciclos diarios de temperatura promueven la germinación de las semillas a través de cambios en la expresión de genes vinculados a las vías metabólicas de las GAs y ABA junto con genes necesarios para el ablandamiento de la pared celular.

4.4.3. Relación entre ciclos diarios de temperatura y genes del oscilador central del reloj circadiano durante la germinación.

En la actualidad poco se sabe acerca de los mecanismos genéticos involucrados en la integración de la señalización por luz y temperatura durante la germinación de las semillas. Teniendo en cuenta que (a) algunos componentes centrales del reloj circadiano están involucrados en la dormición y geminación de las semillas (Penfield & Hall 2009) y que (b) la luz y la temperatura son señales que modulan la expresión de genes del reloj

(Harmer et al., 2009), uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar el rol de los componentes del reloj circadiano como integradores de señales lumínicas y térmicas en la inducción de la germinación en nuestras condiciones experimentales. Para cumplir con dicho objetivo, evaluamos la respuesta de semillas mutantes de algunos componentes centrales del reloj circadiano en respuesta a la luz y temperatura (Fig.4.4.3.1.).

La Fig.4.4.3.1. muestra los porcentajes de germinación en función de las temperaturas de incubación en oscuridad, previas al Rp. Se observó que en semillas Col-0, los ciclos diarios de temperatura (15°C/23°C) promovieron la germinación en niveles mayores al 70%, mientras que las semillas incubadas a temperaturas constantes de 15°C, 17.5°C y 23°C lo hicieron por debajo del 40% (Fig.4.4.3.1.A.). Semillas mutantes de *cca1-1* y *cca1-1/lhy-21* mostraron un patrón similar de germinación a las semillas salvajes Col-0, sugiriendo que estos genes no participan en la germinación de las semillas a las temperaturas alternadas inducidas por un Rp. Interessantemente, las semillas mutantes *prr7-3* y *toc1-1* no respondieron a las temperaturas alternadas de 15°C/23°C, mostrando niveles similares de germinación a aquellas que fueron incubadas a 15°C o 17.5°C, sugiriendo que la respuesta a ciclos diarios de temperatura durante la germinación requiere de la presencia de alelos funcionales *PRR7* y *TOC1* (Fig.4.4.3.1.A.).

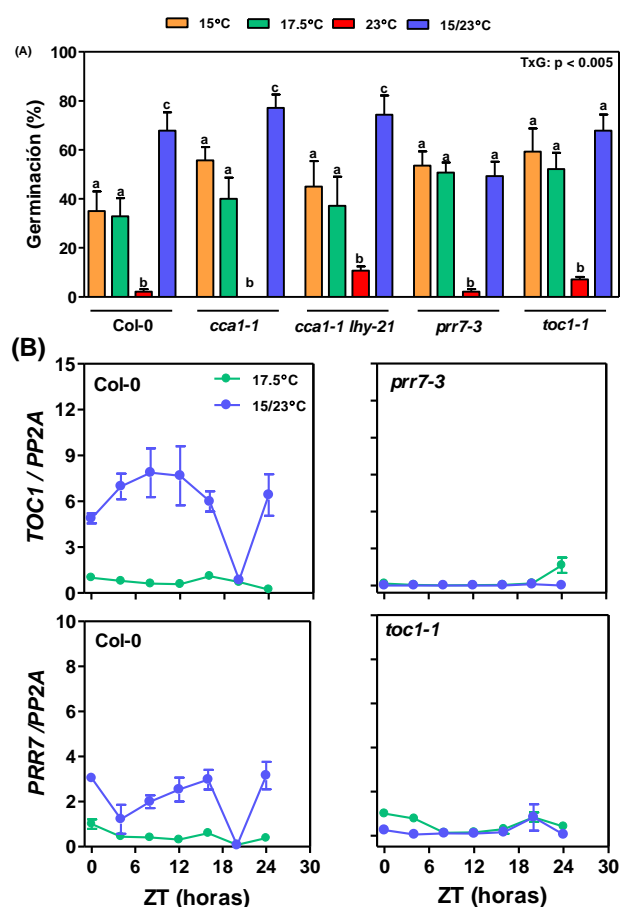


Fig. 4.4.3.1. La promoción de la germinación por ciclos diarios de temperatura requiere de la presencia de alelos funcionales *PRR7* y *TOC1*. (A) Germinación de semillas Col-0 y mutantes de componentes del reloj circadiano embebidas en oscuridad a diferentes temperaturas y luego irradiadas con un Rp. El protocolo experimental utilizado es el mismo que en la Fig.1.A. Cada barra representa la media \pm ES (n=7). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Bonferroni. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias del mismo genotipo ($p < 0.05$). (B) Expresión de *TOC1* y *PRR7* en semillas Col-0, *toc1-1* y *prp7-3* en respuesta a ciclos diarios de temperatura (15/23°C) o temperatura constante (17.5°C). Las muestras se tomaron cada 4 horas a ZT₀. Cada punto representa la media \pm SD. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. (Datos obtenidos con la colaboración de Maximiliano Estravis-Barcala & Verónica Arana).

Dado que los resultados anteriores ponen en relevancia a *PRR7* y *TOC1* en la modulación de la inducción de la germinación por ciclos diarios de temperaturas, decidimos evaluar si la exposición a dichos ciclos de temperatura influye en la expresión de dichos genes en las semillas. Evaluamos la expresión de *TOC1* y *PRR7* tanto en semillas Col-0 como en los mutantes *prp7-3* y *toc1-1* (Fig.4.4.3.1.B.). Las muestras de ARN se cosecharon cada cuatro horas entre las 0 y 24 hs posteriores a los tratamientos térmicos de 15°C/23°C y 17.5°C.

La Fig.4.4.3.1.B. muestra los niveles de expresión de *TOC1* y *PRR7* en función del tiempo de incubación en horas, tanto para ciclos diarios de temperatura como para la

temperatura control. En semillas Col-0 se observó que la expresión de *TOC1* fue promovida en respuesta a ciclos diarios de temperatura, con picos de expresión máxima a ZT_8 y ZT_12. *PRR7* presentó su pico máximo de expresión a ZT_16. Estos patrones de expresión no fueron observados en semillas incubadas a temperatura constante de 17.5°C. Consiste con estos resultados, las semillas mutantes de *prp7-3* y *toc1-1* mostraron el mismo patrón nulo de expresión de *TOC1* y *PRR7* a 15°C/23°C o 17.5°C, respectivamente.

Los resultados tanto de fisiología como de expresión génica demuestran la promoción de la germinación mediada por phyB en respuesta a ciclos diarios de temperatura requiere de la presencia de alelos funcionales *PRR7* y *TOC1*, cuyos patrones cíclicos de expresión génica son estimulados en respuesta a temperaturas alternadas.

4.4.4. Rol de *DOG1* en respuesta a ciclos diarios de temperatura.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos de la importancia de *DOG1* en la dormición y germinación de las semillas, decidimos evaluar el rol de *DOG1* en la respuesta de las semillas a la luz R y a los ciclos diarios de temperatura, evaluando la germinación de semillas Col-0 y *dog1* en respuesta a 17.5°C y 15°C/23°C (Fig.4.4.4.1.).

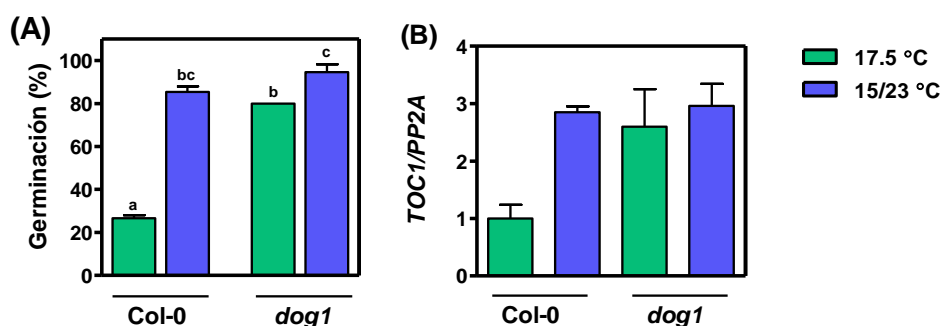


Fig. 4.4.4.1. *DOG1* regula negativamente el efecto de los ciclos diarios de temperatura sobre la germinación. (A) Germinación de semillas Col-0 y mutantes *dog1* embebidas en oscuridad a diferentes temperaturas, previas al Rp. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de un factor seguido de test de Bonferroni ($p < 0.05$). (B) Expresión de *TOC1* en respuesta a ciclos diarios de temperatura (15/23°C) o temperatura constante (17.5°C) en semillas Col-0 y *dog1*. Las muestras se tomaron a ZT_0. Cada punto representa la media \pm SD.

En semillas Col-0, los ciclos diarios de temperatura promovieron la germinación de las semillas en un 85%, mientras que las semillas germinaron un 26% por efecto de la incubación en la temperatura constante de 17.5°C. Interesantemente, las semillas *dog1* germinaron por encima del 80% independientemente de la temperatura de pre-incubación de las semillas (Fig.4.4.4.1.A.). Estos resultados sugieren que DOG1 inhibe la germinación a 17.5°C.

El siguiente paso fue el de evaluar si la expresión de *TOC1* cambia diferencialmente en respuesta a la temperatura en ausencia de DOG1. Para ello se extrajo ARN de semillas Col-0 y *dog1* a ZT_0 (Fig.4.4.4.1.B.). Los ciclos diarios de temperatura 15°C/23°C promovieron la expresión de *TOC1* en semillas Col-0 pero no en semillas *dog1*. Interesantemente, las semillas *dog1* mostraron una acumulación similar de transcriptos tanto a temperatura constante de 17.5°C como a temperaturas alternadas de 15°C/23°C (Fig.4.4.4.1.B.), sugiriendo que *DOG1* inhibe la germinación de las semillas en respuesta a temperaturas constantes en parte mediante la represión de la expresión de *TOC1*. En semillas Col-0 la expresión de *PRR7* a ZT_0 no cambió en respuesta a ciclos diarios de temperatura, probablemente porque su pico de expresión es a ZT_16 (Fig.4.4.3.1.B.). En semillas *dog1* la expresión de *PRR7* se redujo independientemente de la temperatura de incubación de las semillas (Fig.4.4.4.2.).

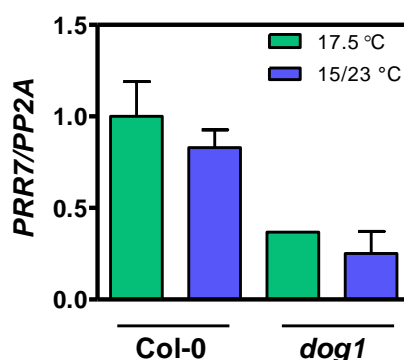


Fig. 4.4.4.2. Expresión de *PRR7* en semillas Col-0 y *dog1*. Expresión de *PRR7* en respuesta a ciclos diarios de temperatura (15/23°C) o temperatura constante (17.5°C) en semillas Col-0 y *dog1*. Las muestras se tomaron a ZT_0. Cada punto representa la media \pm SD.

Finalmente, estudiamos los efectos de los ciclos diarios de temperatura sobre los niveles proteicos de DOG1 usando una línea DOG1 marcada con el epítopo HA y revelada con el anticuerpo monoclonal anti-HA, mediante la técnica de western blot. Para ello se extrajeron proteínas totales de semillas mantenidas en oscuridad a temperaturas alternadas (15°C/23°C) o constante (17.5°C), tanto de la línea transgénica *ProDOG1:3xHA:DOG1* (Nakabayashi et al., 2012) como del genotipo salvaje Col-0

(control negativo, no mostrado). La cosecha del material se realizó luego de los tratamientos térmicos a ZT_0. Se hizo el blot de proteínas con el material cosechado. Los resultados se normalizaron al tratamiento control (sin tratamiento térmico, material cosechado de semillas embebidas por 1 hora en oscuridad).

Las Fig. 4.4.4.3.A. y Fig.4.4.4.3.B. muestran los niveles relativos de proteína DOG1. Se observó que los ciclos diarios de temperatura de 15°C/23°C redujeron significativamente los niveles proteicos de DOG1 con respecto a semillas incubadas en temperaturas constantes de 17.5°C. Los resultados de estos experimentos sugieren que los niveles proteicos de DOG1 se reducen significativamente durante la imbibición en oscuridad de las semillas en temperaturas alternadas previo al estímulo de la germinación por luz.

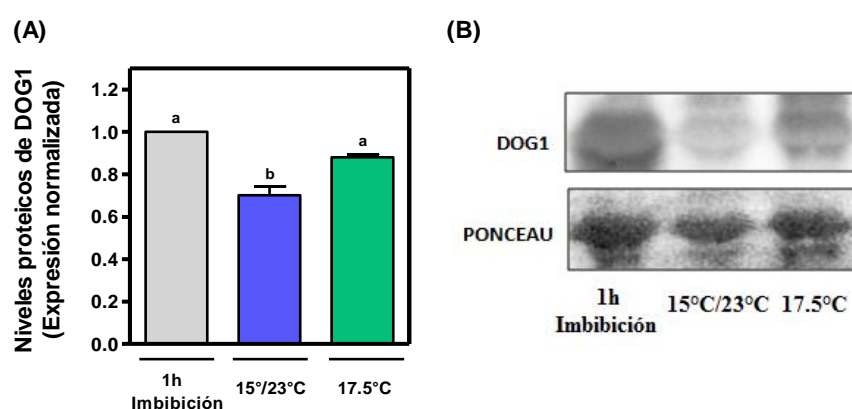


Fig. 4.4.4.3. Los ciclos diarios de temperatura disminuyen la expresión de la proteína DOG1. (A) Cuantificación de los niveles proteicos de DOG1 relativos al control de carga en ZT_0 para semillas *ProDOG1:3xHA:DOG1*. (B) La proteína DOG1 se detectó utilizando el anticuerpo anti-HA. Se utilizó el Ponceau como control de carga. Cada barra representa la media \pm ES (n=3). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de un factor seguido de test de Bonferroni ($p < 0.05$).

Se estudió la respuesta de germinación promovida por un Rp y ciclos diarios de temperatura (15°C/23°C) en semillas de líneas con alelos *DOG1* fuertes (que provienen del ecotipo CVI) y nulos en fondo genético de Ler: NILDOG17-1y *nildog1*, respectivamente (Bentsink et al., 2006) y la sobre-expresión de DOG1 en fondo genético de Col-0. La Fig.4.4.4.4. muestra los porcentajes de germinación de las semillas en función de las temperaturas de incubación previas al Rp. Se observó que la sobre-expresión de DOG1 en el fondo genético Col-0 (DOG1 OX) y la expresión de alelos fuertes DOG1-CVI en el fondo genético Ler (NILDOG17-1), reducen los efectos de las temperaturas alternadas 15°C/23°C en la promoción de la germinación por luz R, confirmando la relevancia de DOG1 mediando las respuestas a temperaturas alternadas en distintos fondos genéticos.

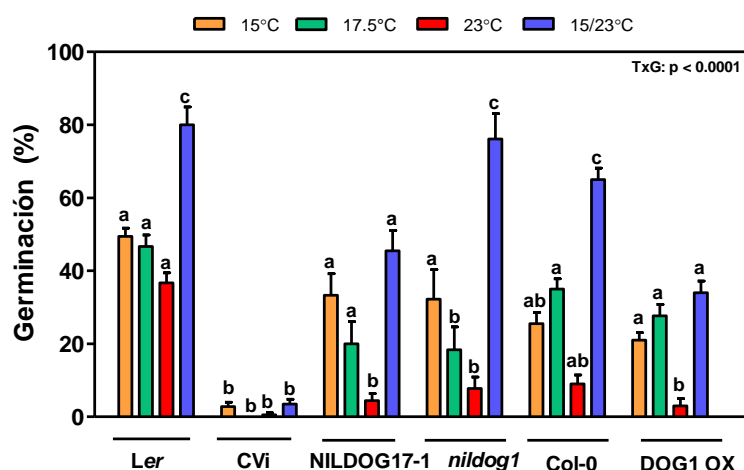


Fig. 4.4.4.4. Variación natural en respuesta a ciclos diarios de temperatura. Germinación inducida por un Rp en semillas Col-0, Ler, CVI, NILDOG17-1, *nildog1* y DOG1 OX. El protocolo experimental utilizado es el mismo que en la Fig.4.4.1.A. Cada barra representa la media \pm ES (n=9). Las diferencias entre medias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Bonferroni. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias del mismo genotipo ($p < 0.05$). (Datos obtenidos con la colaboración de Maximiliano Estravis-Barcala & Verónica Arana).

4.5. DISCUSIÓN.

Los ciclos diarios de temperaturas alternadas son señales ambientales que promueven la ruptura de la dormición y, en consecuencia, contribuyen a definir la dinámica de emergencia de malezas en el campo (Benech-Arnold et al., 2000). Desafortunadamente, este proceso no ha sido estudiado en detalle en el modelo de estudio de *Arabidopsis thaliana*, a excepción de dos estudios muy recientes (Footit et al., 2017; Tophan et al., 2017). Mediante aproximaciones matemáticas y experimentales, el grupo de Bassel demostró que las temperaturas alternadas actúan como señales instructivas en el tipo de la raíz de semillas dormidas que definen la distribución de los metabolitos de las hormonas ABA y GA y su transporte, para romper la dormición (Tophan et al., 2017).

En esta tesis demostramos que la incubación de las semillas de *Arabidopsis* a temperaturas alternadas de 15°C/23°C durante dos días es suficiente para potenciar la respuesta a la luz de las semillas. Interesantemente, la pre-incubación de las semillas a 17.5°C, que establece el mismo tiempo térmico acumulado que las temperaturas alternadas, muestra una reducción significativa de los niveles de germinación (Fig.4.4.1.1.B.), indicando un sinergismo entre las señales luz y temperaturas alternadas para la promoción de la germinación. Si bien la incubación de las semillas en temperaturas alternadas y oscuridad indujo la expresión de algunos genes asociadas con la promoción de la germinación, esa promoción por sí misma no es suficiente para inducir la germinación, ya que las semillas expuestas a un RLp no mostraron diferencias significativas de germinación entre las temperaturas alternadas vs las temperaturas constantes (Fig.4.4.1.1.B.).

La respuesta a las temperaturas alternadas seguida de un pulso de luz es mediada exclusivamente por el fitocromo B, ya que las mutantes *phyB* no responden a ninguna de las dos señales (Fig.4.4.1.1.C.). Sin embargo, no debemos descartar que otros fitocromos estables o el *phyA* puedan ser respondedores a las temperaturas alternadas si la sensibilidad de las semillas a la luz se modifica durante la post maduración. Por ejemplo, la densidad de la vegetación, la profundidad del suelo a la que se encuentran las semillas, la humedad del suelo y la post-maduración son factores que pueden modificar la sensibilidad de las semillas a la luz en algunas especies maleza (Botto et al., 1998; Botto et al., 2000; Battla et al., 2007). Más aún, si bien los fitocromos A y B son los principales fotorreceptores responsables de las respuestas de R y RL en la promoción de la germinación (Botto et al., 1995; Botto et al., 1996; Shinomura et al., 1996), otros fitocromos pueden promover la germinación en ausencia de *phyA* o *phyB* (Henning et al., 2002; Arana et al., 2014). Es interesante notar que la promoción de la germinación por un RLp también cambia a lo largo de un período de 24 horas de duración, sugiriendo un rol del reloj circadiano en el programa de la germinación (Oliverio et al., 2007). Todas estas evidencias sugieren que, aunque el *phyB* es responsable del sinergismo entre luz y temperaturas en nuestras condiciones experimentales, otros fitocromos podrían ejercer su misma función en otro contexto ambiental. En plántulas, el *phyB* participa en la percepción de la temperatura; su tasa de reversión térmica desde la forma activa Pfr hacia la forma inactiva Pr aumenta en el rango entre 4°C y 30°C, permitiendo la expansión celular y el crecimiento del hipocotilo (Jung et al., 2016; Legris et al., 2016). Interesantemente, mutantes de *phyB*

conservan las respuestas del crecimiento dependiente de temperatura revelando la existencia de otros mecanismos termosensores alternativos al phyB (Mazzella et al., 2000; Halliday & Whitelam, 2003). Irradiamos las semillas con un pulso saturante de RL luego de la imbibición, así, las cantidades de Pfr de los fitocromos estables son mínimas cuando las semillas son expuestas a los distintos regímenes térmicos en oscuridad. El phyA no muestra reversión detectable en los ecotipos Columbia y Landsberg (Eichenberg et al., 2000). Así, en nuestras condiciones experimentales, otros mecanismos sensores de temperatura que no necesariamente estén involucrados en la percepción lumínica (aquellos involucrados en la remodelación de la cromatina; Huff & Zilberman, 2012), podrían participar en las respuestas de las semillas a la temperatura.

La expresión de los genes promotores de germinación de las vías del ABA, las GAs y del crecimiento celular se vio promovida en semillas embebidas a 15°C/23°C pero no bajo incubación a 17.5°C (Fig.4.4.2.1.). La promoción de la germinación por temperaturas alternadas requiere la expresión de los genes del reloj *TOC1* y *PRR7* (Fig.4.4.3.1.). Interesantemente, otros genes del reloj no parecen ser necesarios para la promoción de la germinación en nuestras condiciones experimentales, ya que las mutantes *lhy-21* y *cca1-1* responden normalmente a las temperaturas alternadas (Fig.4.4.3.1.A.). La expresión de *TOC1* es reprimida por las proteínas LHY y CCA1, que se unen directamente a su promotor hacia el amanecer (Alabadí et al., 2001; Mizoguchi et al., 2002). Más aún, los niveles proteicos de TOC1 aumentan durante la noche y activan la expresión de *CCA1* antagonizando la acción de CHE, un represor transcripcional de *CCA1* (Pruneda-Paz et al., 2009). Otros genes *PRR* que pertenecen al *loop* matutino son necesarios para el correcto funcionamiento del reloj (Matsushika et al., 2000). En una aproximación experimental en la que se simulaban ciclos de dormición utilizando mutantes de genes del reloj circadiano, Footitt et al. (2017) encontraron que los elementos pertenecientes al *loop* central del reloj (i.e. CCA1, LHY y TOC1) contribuyen a reducir la sensibilidad de las semillas al ABA, y las semillas mutantes de estos genes entraron más rápidamente en dormición secundaria a 25°C. Contrariamente, aquellos elementos del reloj que pertenecen al *loop* matutino (i.e. PRR5, PRR7 y PRR9) presentaron una sensibilidad al ABA mayor, y las semillas mutantes de estos genes entraron más lentamente en dormición secundaria. Más aún, otro estudio anterior demostró que la germinación de las semillas *cca1 lhy* expuestas a ciclos de oscuridad/luz y temperaturas alternadas de 17°C/27°C era mayor que la respuesta del genotipo salvaje, mientras que la sobre-expresión de dichos genes mostró un fenotipo opuesto, sugiriendo que ambos componentes del reloj son capaces de inhibir la germinación en estas condiciones (Penfield & Hall, 2009). También se ha demostrado que los genes *CCA1* y *GI* regulan la germinación en respuesta a la estratificación y la post-maduración (Penfield & Hall, 2009), y la expresión de *CCA1* pero no de *LHY* están vinculadas a la respuesta de las plántulas al nitrato (Gutierrez et al., 2008). Todas estas evidencias sugieren que distintos genes del reloj son capaces de integrar las señales ambientales para ajustar finamente el programa de desarrollo de las plantas, como lo son la salida o inducción de la dormición, la promoción de la germinación o el crecimiento de las plántulas.

En esta tesis demostramos además que *DOG1*, un gen que impone dormición en las semillas, inhibe la respuesta de las semillas a los ciclos diarios de temperaturas alternadas reprimiendo la germinación y la expresión de *TOC1* en temperatura constante (Fig.4.4.4.1.). Adicionalmente, la incubación de las semillas en temperaturas alternadas reduce significativamente los niveles proteicos de DOG1 (Fig.4.4.4.3.) permitiendo así

la expresión del gen *TOC1*. En concordancia con estos resultados, la sobre-expresión de *DOG1* inhibió la promoción de la germinación por luz R en respuesta a temperaturas alternadas (Fig.4.4.4.4.). Más aún, el efecto de las temperaturas alternadas sobre la germinación fue variable entre accesiones con distintos niveles de dormición: sin respuesta para CVI (un genotipo que presenta altos niveles de dormición) y respuestas intermedias y altas para Ler y Col-0, respectivamente. Concordantemente, la presencia de alelos fuertes *DOG1*-CVI redujo la respuesta a temperaturas alternadas en las semillas NILDOG17-1 (Fig.4.4.4.4.). En base a estos resultados no podemos discriminar si *DOG1* altera las respuestas a las temperaturas alternadas de forma directa o indirecta. Sin embargo, observamos que *TOC1* promovió la germinación de las semillas en respuesta a temperaturas alternadas (Fig.4.4.3.1.) y que *DOG1* reprimió la expresión de *TOC1* en respuesta a temperatura constante (Fig.4.4.4.1.). Podemos asumir que la disminución de los niveles proteicos de *DOG1* en respuesta a temperaturas alternadas permite la ocurrencia de patrones diarios de expresión de *TOC1* en oscuridad. Interesantemente, *DOG1* inhibe la expresión de genes de síntesis de GA y de genes de ablandamiento de la pared celular de forma dependiente de la temperatura para controlar el tiempo de germinación (Graeber et al., 2014). De hecho, tanto en *Arabidopsis* como en *Lepidium sativum*, la sobre-expresión de *DOG1* disminuye la respuesta de germinación a temperatura constante de 24°C comparada con la temperatura de 18°C. Esto ocurre mediante la modificación de la biosíntesis de GA y la represión de la expresión de genes de ablandamiento de la pared celular (Graeber et al., 2014).

Concluimos que algunos de los elementos que componen el reloj circadiano están involucrados en la integración de las señales lumínicas y térmicas para ajustar finamente la salida de la dormición. Esta sincronización de la germinación por la acción sinérgica de ambas señales podría tener consecuencias de importancia ecológicas y adaptativas en la persistencia de las semillas en los bancos del suelo.

4.6. CONCLUSIONES.

Los resultados expuestos en esta tesis demuestran que en semillas de *Arabidopsis thaliana*: (1) Los ciclos diarios de temperatura promueven la germinación mediada por phyB y esto está asociado a la regulación de la expresión de genes de germinación y requiere de la presencia de alelos funcionales *PRR7* y *TOC1*. (2) Los ciclos diarios de temperatura promueven la expresión de los genes *PRR7* y *TOC1*. (3) *DOG1* regula negativamente la acción de los ciclos diarios de temperatura sobre la germinación. (4) Los ciclos diarios de temperatura regulan negativamente la acumulación de la proteína *DOG1*.

CAPÍTULO 5.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

5.1. Introducción.

En este capítulo se discutirán los principales resultados obtenidos en la tesis dentro del marco de conocimientos generales acerca de los procesos que rompen la dormición e inducen la germinación de las semillas por luz y temperatura. Primero discutiré los resultados obtenidos en el marco de las hipótesis planteadas en cada capítulo. Segundo, plantearé nuevos interrogantes y futuras líneas de trabajo en el área de pertinencia. Tercero, discutiré cómo los conocimientos generados se complementan y aportan al marco teórico general sobre la temática. En cuarto lugar, discutiré el aporte de los resultados obtenidos y sus posibles aplicaciones para el manejo de la germinación de las semillas de cultivos y malezas. Por último, sintetizaré las principales conclusiones generales de la tesis.

5.2. Resultados principales y evaluación de las hipótesis de trabajo.

A pesar de que la luz es una señal relevante para la inducción de la germinación en semillas de muchas especies en distintas condiciones ecológicas, aún existe una falta absoluta de información sobre la regulación a nivel de *splicing* del ARNm (regulación post-transcripcional) en el fotocontrol de este proceso. En el capítulo 2 de la tesis planteamos como objetivo identificar y estudiar genes y variantes de *splicing* alternativo (SA) que se expresan en semillas inducidas a germinar por luz R. Para cumplir dicho objetivo analizamos el impacto global que ejerce la luz sobre el procesamiento alternativo de pre-ARNm. Utilizando semillas Col-0 y mutantes de fitocromo A y fitocromo B confirmamos la hipótesis 1: una fracción significativa de genes promovidos por luz presentan SA; y aceptamos parcialmente la hipótesis 2: el fitocromo B es el fotorreceptor responsable de promover el SA de los genes inducidos diferencialmente por luz. La hipótesis 1 de trabajo fue aceptada, dado que demostramos mediante diferentes aproximaciones experimentales que una fracción de genes que son promovidos por luz, presenta SA (Fig.2.4.2.1. y Fig.2.4.5.1.). La hipótesis 2 de trabajo pudo ser confirmada parcialmente porque sólo algunos de los genes evaluados son regulados por el phyB, y en ciertos casos, el SA puede ser regulado por el phyA en nuestras condiciones experimentales (Fig.2.4.6.2. y Fig.2.4.6.3.). Nuestros resultados nos permiten afirmar que el SA es un mecanismo de control relevante para un grupo significativo de genes que cambian su expresión en semillas inducidas a germinar por luz, confiriendo un nivel adicional de regulación génica para la salida de la dormición.

En el capítulo 3 de la tesis estudiamos los cambios globales que ocurren a nivel transcripcional en respuesta a la luz R tanto de la familia de factores de transcripción como de los patrones de expresión génica regulados por hormonas necesarias para inducir el proceso. Cuando analizamos nuestro transcriptoma, observamos que el factor de transcripción *ATHB2* aparece como el gen número 18 con mayor nivel de cambio en su expresión génica en respuesta a la luz R (Fig. Anexo 3.4.1.1.1.). Si bien es un gen que aparece diferencialmente regulado por luz en varios microarreglos de semillas de *Arabidopsis* expuestas a la luz R o RL (Oh et al., 2009; Ibarra et al., 2013; Shi et al., 2013), a la fecha no existe ninguna evidencia que estudie funcionalmente a *ATHB2* en este proceso. Esto nos llevó a plantear las dos hipótesis de trabajo: (1) *ATHB2* es un

inhibidor de la germinación inducida por luz y (2) *ATHB2* participa en el metabolismo y la vía de señalización del ABA. Ambas hipótesis de trabajo pudieron ser confirmadas mediante diferentes aproximaciones fisiológicas y moleculares. Los resultados expuestos en este capítulo nos permiten sugerir que *ATHB2* participa en la vía de señalización de PIF1/PIL5 y en el metabolismo y la vía de señalización por ABA (Fig.3.4.1.3.1.A.; Fig.3.4.1.4.2. y Fig.3.5.1.). En este sentido sabemos que las señales transcripcionales en las células son integradas por señales químicas como las hormonas. Entre ellas, las GAs que promueven y el ABA que inhibe la germinación de las semillas. La tercera hipótesis que planteamos dentro del capítulo 3 postula que las auxinas son hormonas relevantes en el proceso de germinación mediado por luz R e involucra mecanismos asociados a su transporte. Dicha hipótesis pudo ser confirmada, y los datos obtenidos indican que la germinación inducida por luz R modifica los niveles de auxinas en las semillas y los transportadores PIN3, PIN7 y AUX1 contrastan los efectos inhibitorios del ABA (Fig.3.4.2.1.1.; Fig. 3.4.2.3.1.; Fig.3.4.2.4.1. y Fig.3.4.2.4.2.). Nuestros resultados sugieren que *ATHB2* podría ser un componente necesario en la integración de las señales hormonales de auxinas y ABA.

En numerosas especies se ha demostrado que las temperaturas alternadas actúan como una señal efectiva que provee a las semillas información sobre la profundidad del suelo a la que se encuentran y la cobertura del suelo que las rodea (Benech-Arnold et al., 1988; Ghera et al., 1992). Aunque existen algunas especies que sólo requieren de temperaturas alternadas para romper la dormición e iniciar la germinación, otras necesitan no sólo las temperaturas alternadas sino también la luz (Baskin & Baskin, 1998). Sin embargo, desconocemos cómo ambas señales ambientales se integran para iniciar la germinación. En el capítulo 4 de esta tesis planteamos como hipótesis de trabajo que (1) la exposición a temperaturas alternadas modula la expresión de genes del reloj circadiano en semillas y esto se encuentra asociado a cambios en la sensibilidad a la luz R en la promoción de la germinación y (2) la proteína DOG1 condiciona la integración de señales térmicas y lumínicas afectando la expresión de los genes del reloj circadiano. Utilizando aproximaciones fisiológicas y moleculares confirmamos ambas hipótesis y demostramos que la exposición de las semillas de *Arabidopsis* a temperaturas alternadas y luz promueve la expresión de los genes *TOC1* y *PRR7* del reloj circadiano (Fig.4.4.3.1.B.). La proteína DOG1 participa en la señalización para la integración de señales térmicas y lumínicas y reduce la expresión de *TOC1* (Fig.4.4.4.1. y Fig.4.4.4.2.). La sincronización de la germinación mediante la acción sinérgica de la luz y la temperatura sobre la actividad del reloj circadiano permitiría ajustar la emergencia de la futura plántula al momento y lugar más oportuno para su establecimiento.

5.3. Perspectivas sobre futuras aproximaciones experimentales.

Si bien hemos comenzado a caracterizar el modo en que la luz regula el SA de algunos genes, y comenzamos a caracterizar la función del factor de *splicing* *RS31* en la promoción de la germinación por luz, aún quedan muchas preguntas por responder. Para ello, nuevos experimentos deben ser diseñados con el fin de indagar sobre los mecanismos de acción de *RS31* en la red de señales moleculares de los fitocromos y cómo modula la salida de la dormición por luz en semillas. El hecho de haber

demostrado que no todos los genes fueran regulados exclusivamente por el fitocromo B (hipótesis 2), nos lleva a plantear nuevas hipótesis de trabajo. Sería interesante evaluar si son las señales retrógradas generadas por la mitocondria las que regulan dicho proceso en nuestras condiciones. Esta hipótesis se sustenta en evidencias que demuestran que la mitocondria es capaz de regular el SA a través de señales retrógradas en raíces de *Arabidopsis* (Petrillo et al., datos no publicados). Se sugiere que la sacarosa, generada durante la fotosíntesis y movilizada hacia las raíces, es "la moneda de cambio" con la cual las hojas le comunican a las raíces las variaciones en el ambiente lumínico, siendo las mitocondrias de la raíz las involucradas en esa vía de señalización (Petrillo et al., datos no publicados). Actualmente sabemos que la luz puede modular a distintos niveles la expresión génica, incluyendo al proceso de SA, a través de diferentes vías de señalización (Chen et al., 2004). Si deseamos comprender el impacto fisiológico de la comunicación entre diferentes tejidos y organelas, determinar qué isoformas de SA pueden ser favorecidas en respuesta a la luz y de qué manera su expresión es controlada en semillas es prioritario.

Por otro lado, sería interesante evaluar la distribución y movilización de proteínas transportadoras de auxinas en nuestras condiciones de estudio. Por ello resulta interesante realizar nuevos ensayos utilizando semillas transgénicas que contengan construcciones de los promotores de genes de interés fusionados a proteínas fluorimétricas o colorimétricas (i.e., GUS, GFP, YFP). Estos materiales pueden ayudarnos así mismo a caracterizar los patrones espacio-temporales de expresión de los transportadores involucrados documentamos en esta tesis (AUX1, PIN3 y PIN7). También resulta interesante comprender los mecanismos de señalización que actúan entre los transportadores y factores de transcripción de la vía de señalización por ABA, particularmente ATHB2, dado que demostramos que la inhibición de la germinación por ABA es contra-restada en presencia de dichos transportadores y que ATHB2 reprime la expresión de *PIN7*. A la luz de estos resultados, sería interesante evaluar si otros transportadores PIN o LAX3 (Like AUX1, transportador de influjo) son también regulados por ATHB2 en semillas expuestas a la luz y cuál es el mecanismo de acción molecular subyacente.

5.4. Contribución de los resultados obtenidos al marco teórico del problema.

En esta tesis hemos demostrado por primera vez que la luz regula la salida de la dormición y la promoción de la germinación no sólo a nivel transcripcional, sino que también lo hace a nivel post-transcripcional, modulando el SA de numerosos genes, siendo una forma de control independiente, al menos en parte, de la regulación de la expresión génica. Las evidencias aquí expuestas son las primeras documentadas acerca del control global del SA en semillas que germinan con luz. Estudios previos han documentado el rol de la luz sobre el SA en otros procesos fisiológicos que ocurren en *Arabidopsis* y musgos (Shikata et al., 2014; Wu et al., 2014, respectivamente), y algunos de los genes de factores de *splicing* aquí descriptos han sido descriptos como relevantes en otros procesos biológicos que ocurren en la planta (Shikata et al., 2013; Petrillo et al., 2014). En otros casos, se han documentados eventos de *splicing* alternativo en genes específicos asociados al proceso de dormición como *PIF6*, *DOG1* o *ABI3* (Penfield et al., 2010; Bentsink et al., 2010 y Nakabayashi et al., 2015; Sugliani

et al., 2010, respectivamente). Si bien nuestros descubrimientos al respecto son un avance importante, aún desconocemos los mecanismos moleculares de la regulación de los factores de *splicing* y en qué tejido/s de la semilla podría estar ocurriendo dicha regulación.

A pesar de su importancia adaptativa, la dormición puede ser una característica agronómica no deseable (Bewley, 1997), dado que una dormición muy profunda en semillas de cultivos puede afectar la densidad deseada de plantas teniendo impacto sobre el rendimiento de los mismos (Benech-Arnold et al., 2000). En este sentido, generar conocimientos de las señales del ambiente que terminan la dormición de las semillas, como la luz y las temperaturas alternadas, es importante. Esta tesis pone de relieve la importancia de algunos elementos del reloj circadiano en este proceso. Si bien un primer intento de hallar un vínculo entre la expresión de genes del reloj circadiano y las temperaturas alternadas fue descrito anteriormente sin mucha profundidad (Penfield & Hall, 2009), en esta tesis caracterizamos funcionalmente la participación de dos genes del reloj (*TOC1* y *PRR7*) en la promoción de la germinación por luz R. Demostramos así mismo que *DOG1* reduce sus efectos inhibitorios durante la imbibición de las semillas en oscuridad y temperaturas alternadas permitiendo que *TOC1* promueva la germinación cuando las semillas son expuestas a un Rp (Arana et al., 2017).

La importancia de *DOG1* en la imposición de la dormición de semillas de *Arabidopsis thaliana* y otras especies está ampliamente documentada (Alonso-Blanco et al., 2003; Bentsink et al., 2006; Teng et al., 2008; Chiang et al., 2011; Kendall et al., 2011; Graeber et al., 2012; Footitt et al., 2015; Nakabayashi et al., 2015; Cyrek et al., 2016; Dekkers et al., 2016; Huo et al., 2016; Footitt et al., 2017). En esta tesis demostramos que genotipos naturales de *Arabidopsis* con mayores niveles de dormición y alelos fuertes de *DOG1* muestran una menor respuesta a las temperaturas alternadas (Arana et al., 2017). Se ha propuesto que *DOG1* forma parte de un mecanismo de sensado térmico que mide el paso del tiempo siendo la acumulación de *DOG1* lo que representa al tiempo térmico acumulado y esto regula el nivel y la persistencia de la dormición (Footitt et al., 2014). Trabajando con semillas de *Arabidopsis* enterradas en el suelo, se ha demostrado que los perfiles transcripcionales de *DOG1* correlacionan negativamente con los ciclos de temperatura del suelo (Footitt et al., 2011, 2013). Por otra parte, nuestro grupo de investigación demostró que *DOG1* determina la respuesta a la luz de las semillas de *Arabidopsis* (Laserna et al., 2008). Semillas mutantes que no expresan *DOG1* responden mejor a muy bajos flujos de luz indicando que *DOG1* inhibe la respuesta a la luz de las semillas. Esto sugiere que las variaciones naturales alélicas en *DOG1* contribuyen a la imposición y salida de la dormición por factores ambientales como la temperatura y la luz permitiendo el ajuste de la germinación de las semillas a las condiciones más favorables para el establecimiento exitoso de la futura plántula (Chiang et al., 2011; Kronholm et al., 2012).

Considerando que las semillas de *Arabidopsis* tienen poca dormición, resulta interesante explorar en semillas de otras especies con mayor dormición la relevancia de los componentes del reloj aquí descritos en el control de la germinación por temperaturas alternadas y luz. Por ejemplo, sería interesante estudiarlo en granos de girasol, dado que los aquenios suelen presentar altos niveles de dormición a cosecha (Corbineau et al., 1990). Se ha encontrado que existe una fuerte correlación entre la emergencia que ocurre en el campo y la germinación que ocurre en condiciones

simuladas de laboratorio en akenios de girasol de una línea endocriada que presenta dormición impuesta por el pericarpio (M. Gerbaldo, Dow AgroSciences, personal communication, 2010), incubados a temperaturas alternadas de 12 hs 15°C/ 12 hs 35°C, sugiriendo que la dormición impuesta por el pericarpio puede ser atenuada debido a la prevalencia de fluctuaciones térmicas del suelo (Dominguez et al., 2016). Estas evidencias junto a las documentadas en esta tesis sugieren que compontes del reloj circadiano podrían estar involucrados en la terminación de la dormición por temperaturas alternadas en semillas de esta especie.

La integración de señales endógenas y ambientales para el ajuste del proceso germinativo requiere de la participación de factores de transcripción que regulen la maquinaria transcripcional en las células. En este contexto identificamos a *ATHB2* como un regulador negativo de la germinación inducida por luz. Se ha documentado que *ATHB2*, junto con otros miembros de la misma sub-familia como *ATHB4* y *HAT3*, promueven el transporte de auxinas y las respuestas a auxinas durante la embriogénesis (Turchi et al., 2013) y nuestros datos demuestran que *ATHB2* ejerce su función probablemente a través de las vías de señalización hormonal de las auxinas y el ABA en las semillas. La luz reduce los niveles de auxina en la semilla embebida en las primeras 24 hs posteriores al Rp y luego promueve la síntesis de auxinas, sugiriendo que esta hormona es relevante durante la salida de la dormición y la promoción de la germinación. Más aún, su acción requiere de su transporte, pre-requisito necesario para la inducción de la germinación. Algunos de nuestros resultados que indican que las auxinas actuarían como reguladores positivos de dicho proceso, podrían asociarse a la vía de acción de las GAs, ya que se ha demostrado que dicha hormona regula positivamente la expresión de varios genes auxínicos que codifican para proteínas de biosíntesis y transporte (i.e., *AUX1*, *PIN2*, *PIN7*; Ogawa et al., 2013). Esto sugiere que cuando las semillas germinan promovidas por el incremento de las GAs, éstas promueven la síntesis y el transporte de auxina.

5.5. Contribución de los resultados obtenidos y posibles aplicaciones prácticas.

Ahora bien, es necesario preguntarse de qué modo los conocimientos generados en esta tesis podrían ser relevantes en la producción de semillas de especies con valor comercial, y por otra parte, comprender mejor los fenómenos específicos relacionados con las malezas y su comportamiento en los bancos de semillas. En este contexto, comprender cómo la luz y las temperaturas alternadas modulan los diferentes niveles posibles de regulación génica (transcripcional y post-transcripcional), puede ayudarnos a identificar blancos moleculares que regulen las respuestas de salida de la dormición por luz y temperaturas alternadas. En ciertos casos durante el desarrollo de los programas de mejoramiento, se han obtenido lotes de semillas con niveles de dormición altos que no son adecuados para la inserción del genotipo al mercado. La información generada en esta tesis incrementa el conocimiento sobre genes que son importantes en el control de la salida de la dormición por luz y temperatura. Algunos de estos genes pueden ser responsables de la adquisición de una alta dormición en genotipos de cultivos sobre los cuales habría que focalizarse para reducir la dormición y de esta manera reducir los niveles de dormición altos de semillas con valor comercial.

Por otra parte, nuestros resultados pueden ayudarnos a comprender cuáles son los factores del ambiente y los mecanismos subyacentes que controlan los flujos de emergencia de plántulas de malezas. Este conocimiento podría ser importante para diseñar prácticas de manejo más racionales con el objeto de reducir la emergencia de malezas durante la implantación de los cultivos. Las semillas de una maleza están sujetas a fluctuaciones diarias de temperatura, por lo que el número de plántulas que emerge dependerá de la fracción de semillas que se encuentre en el rango adecuado para inducir la germinación (Batlla, 2004). Además, las semillas anuales de muchas especies tienen requerimientos cíclicos de sensibilidad a los factores que terminan la dormición como la luz y las temperaturas alternadas (Karssen, 1995, Baskin & Baskin, 1987; Bewley & Black, 1994; Lowe et al., 1999). Estos factores varían tanto durante el día como a lo largo del año. Se ha demostrado que existe una correlación entre los patrones de expresión génica y los niveles de dormición en semillas de *Arabidopsis* en ambientes naturales (Footitt et al., 2011, 2013, 2017). Por ejemplo, los altos niveles de dormición que se establecen durante el invierno, correlacionan con las bajas temperaturas del suelo y con la promoción de la expresión de algunos genes de síntesis y degradación de ABA y GA (*NCED6* y *GA2ox2*, respectivamente). Esto se traduce en un aumento en el contenido y señalización de ABA. Más aún, estos altos niveles de dormición tienen una fuerte correlación con un aumento en la expresión del gen *DOG1* (Footitt et al., 2011, 2013, 2017). De acuerdo a la información generada en esta tesis, podemos pensar que las temperaturas alternadas preparan a las semillas para responder a la luz reduciendo los niveles de la proteína DOG1 y modulando la expresión de genes promotores de la germinación. Los ciclos diarios de temperaturas alternadas podrían ser una señal importante para modular la expresión de los genes del reloj circadiano. El conocimiento conjunto del efecto que ejercen los distintos factores ambientales y cómo los mismos son integrados a nivel molecular, puede ayudarnos a comprender la dinámica de la germinación de las semillas y permitirnos predecir en forma más robusta los patrones de emergencia de malezas.

5.6. Conclusiones generales.

Los datos expuestos en esta tesis contribuyen a comprender cómo las señales lumínicas y térmicas son integradas en las semillas para ajustar la ocurrencia de la germinación a las condiciones favorables para el establecimiento exitoso de la futura plántula. La integración de estas señales involucra distintos niveles jerárquicos de control de la red de señalización transcripcional que incluyen la regulación de la expresión génica y el SA junto con la integración de señales hormonales. Si bien estos resultados fueron obtenidos utilizando semillas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, resulta interesante explorar si estos marcos teóricos son válidos también para otras especies de semillas cuya germinación sea inducida por luz y temperaturas alternadas.

CAPÍTULO 6.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alabadí D, Blázquez MA. 2009. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Mol Biol.** 69:409-17.
- Alabadí D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Más P. & Kay S.A. 2001. Reciprocal regulation between *toc1* and *lhy/cca1* within the *Arabidopsis* circadian clock. **Science.** 293: 880-883.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C y Truong HN. 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Cell Environ.** 28: 500-512.
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P y Jullien M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. **Planta.** 219: 479-488.
- Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Koornneef M. 2003. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics.** 164:711-29
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A. 2010. Seed desiccation: A bridge between maturation and germination. **Trends Plant Sci.** 15:211–218.
- Arana M.V., Burgin M.J., de Miguel L.C. & Sánchez R.A. 2007. The very-low-fluence and high-irradiance responses of the phytochromes have antagonistic effects on germination, mannan-degrading activities, and DfGA3ox transcript levels in *Datura ferox* seeds. **JEB.** 58: 3997-4004.
- Arana M.V., Sánchez-Lamas M., Strasser B., Ibarra S.E., Cerdán P.D., Botto J.F. & Sánchez R.A. 2014. Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. **Plant Cell & Environment.** 37: 2014-2023.
- Arana MV, de Miguel LC, Sánchez RA. 2006. A phytochrome-dependent embryonic factor modulates gibberellin responses in the embryo and micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds. **Planta.** 223:847-57.
- Archambault J, Friesen JD. 1993. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. **Microbiol Rev.** 57: 703-724.
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL. 2007. The true story of the HDZip family. **Trends in Plant Science.** 12, 419-426.
- Ariizumi T, Hauvermale AL, Nelson SK, Hanada A, Yamaguchi S, Steber CM. 2013. Lifting della repression of *Arabidopsis* seed germination by nonproteolytic gibberellin signaling. **Plant Physiol.** 162:2125-39.
- Ashikawa I, Abe F, Nakamura S. 2010. Ectopic expression of wheat and barley DOG1-like genes promotes seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant Science.** 179: 536–542.
- Ashikawa I, Abe F, Nakamura S. 2013. DOG1-like genes in cereals: investigation of their function by means of ectopic expression in *Arabidopsis*. **Plant Science.** 208: 1–9.

- Auge GA, Perelman S, Crocco CD, Sánchez RA, Botto JF. 2009. Gene expression analysis of light-modulated germination in tomato seeds. **New Phytol.** 183:301-14.
- Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel J. 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. **PLoS Genet.** 2, e106.
- Barbazuk WB, Fu Y, McGinnis KM. 2008. Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges. **Genome Res.** 18:1381–1392
- Barrero JM, Downie AB, Xu Q, Gubler F. 2014. A role for barley CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination. **Plant Cell.** 26: 1094–1104.
- Baskin C & Baskin J. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego: Academic Press.
- Basu D, Dehesh K, Schneider-Poetsch HJ, Harrington SE, McCouch SR, Quail, PH. 2000. Rice *PHYC* gene: Structure, expression, map position and evolution. **Plant Mol. Biol.** 44:27–42.
- Batlla D & Benech-Arnold RL. 2015. A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. **Seed Science Research.** 25:147-158.
- Batlla D, Kruk BC, Benech-Arnold R. 2000. Very early detection of canopy presence by seeds through perception of subtle modifications in red:far red signals. **Functional Ecology.** 14:195–202.
- Batlla D., Nicoletta M. & Benech-Arnold R. 2007. Sensitivity of *Polygonum aviculare* seeds to light as affected by soil moisture conditions. **Annals of Botany.** 99: 915-924.
- Belin C, Megies C, Hauserová E, Lopez-Molina L. 2009. Absciscic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. **Plant Cell.** 21:2253-68.
- Benech-Arnold R.L., Ghera C.M., Sánchez R.A. & García Fernandez A.E. 1988. The role of fluctuating temperatures in germination and establishment of *Sorghum halepense*. Regulation of germination under leaf canopies. **Functional Ecology.** 2: 311-318.
- Benech-Arnold R.L., Sánchez R.A., Forcella F., Kruk B.C. & Ghera C.M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. **Field Crops Research.** 67: 105-122.
- Benjamini Y & Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J. R. Stat. Soc. Ser. B.** 57: 289–300.
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M. 2006. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103:17042-7.

- Bentsink L, Hanson J, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Coltrane C, Keizer P, El-Lithy M, Alonso-Blanco C, de Andrés MT, Reymond M, van Eeuwijk F, Smeekens S, Koornneef M. 2010. Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 107:4264-9.
- Bewley JD & Black M. 1982. The Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination, vol. 2. New Cork: **Springer Verlag**.
- Bewley JD, Black M. 1994. Seeds: physiology of development and germination, 2nd edn. New York, London: **Plenum Press**.
- Bewley JD. 1997. Seed Germination and Dormancy. **Plant Cell**. 9:1055-1066.
- Blochl A, Grenier-de March G, Sourdioux M, Peterbauer T, Richter A. 2005. Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.) **Plant Sci**. 168:1075–1082.
- Boccard-Gifford I, Lynch T, Garcia M, Malhotra B, Finkelstein R. 2004. The *Arabidopsis thaliana* abscisic acid-insensitive8 locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. **Plant Cell**. 16: 406-421.
- Botto J.F., Sánchez R.A. & Casal J.J. 1995. Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**. 146: 307-312.
- Botto J.F., Sánchez R.A. & Casal J.J. 1998. Burial conditions affect the light responses of *Datura ferox* seeds. **Seed Science Research**. 8: 423-429.
- Botto J.F., Sánchez R.A., Whitlam G.C. & Casal J.J. 1996. Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 110: 439-444.
- Botto JF, Scopel AL, Ballaré CL, Sánchez RA. 1998. The effect of light during and after soil cultivation with different tillage implements on weed seedling emergence. **Weed Science**. 46: 351-357.
- Botto JF, Scopel AL, Sánchez, RA. 2000. The photoinduction of weed seed germination during soil disturbance depends on soil water status after cultivation. **Australian Journal of Plant Physiology**. 27: 463-471.
- Bouwmeester H & Karssen C. 1989. Environmental factors influencing the expression of dormancy patterns in leed seeds. **Annals of Botany**. 63:113-120.
- Bouwmeester H.J., Derks L., Keizer J.J. & Karssen C.M. 1994. Effects of endogenous nitrate content of *Sisymbrium officinale* seeds on germination and dormancy. **Acta Botanica Neerlandica**. 43: 39-50.
- Bouwmeester HJ. 1990. The effect of environmental conditions on the seasonal dormancy pattern of weed seeds. Ph.D. thesis, Agricultural University in Wageningen, pp. 5-156.

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248–254.
- Brett D, Pospisil H, Valcarcel J, Reich J, Bork P. 2002. Alternative splicing and genome complexity. **Nat Genet**. 30: 29–30
- Brown JWS. et al. 2015. Lost in Translation : Pitfalls in Deciphering Plant Alternative Splicing Transcripts. **Plant Cell**. 27: 2083–2087.
- Brummell DA, Chen RKY, Harris JC, Zhang HB, Hamiaux C, Kralicek AV, McKenzie MJ. 2011. Induction of vacuolar invertase inhibitor mRNA in potato tubers contributes to cold-induced sweetening resistance and includes spliced hybrid mRNA variants. **J. Exp. Bot**. 62:3519–3534.
- Cadman CS, Toorop PE, Hilhorst HW, Finch-Savage WE. 2006. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. **Plant J**. 46: 805–822.
- Campbell MA, Haas BJ, Hamilton JP, Mount SM, Buell CR. 2006. Comprehensive analysis of alternative splicing in rice and comparative analyses with Arabidopsis. **BMC Genomics**. 7:327
- Carabelli M, Morelli G, Whitelam G, Ruberti I. 1996. Twilight-zone and canopy shade induction of the *ATHB-2* homeobox gene in green plants. **Proc Natl Acad Sci USA**. 93: 3530–3535.
- Carvalho SD, Saraiva R, Maia TM, Abreu IA, Duque P. 2012. XBAT35, a novel Arabidopsis RING E3 ligase exhibiting dual targeting of its splice isoforms, is involved in ethylene-mediated regulation of apical hook curvature. **Mol Plant**. doi:10.1093/mp/sss048
- Casal JJ, Davis SJ, Kirchbauer DJ, Viczian A, Yanovsky MJ, Clough RC, Kircher S, Jordan-Beebe ET, Schäfer E, Nagy F, Vierstra RD. 2002. The serine-rich N-terminal domain of oat phytochrome A helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor. **Plant Physiology**. 129: 1127–1137.
- Casal JJ, Luccioni L, Oliverio KA, Boccalandro HE. 2003. Light, Phytochrome Signalling and photomorphogenesis in Arabidopsis. **Photochemical and Photobiological Sciences**. 2: 625–636.
- Casal JJ, Sánchez RA, Di Benedetto AH, De Miguel L. 1991. Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome. **Photochemistry and Photobiology**. 53:249–254.
- Casal JJ, Sánchez RA. 1998. Phytochromes and seed germination. **Seed Science Research**. 8:317–329.
- Chen T, Cui P, Chen H, Ali S, Zhang S, Xiong L. 2013. A KH-domain RNA-binding protein interacts with FIERY2/CTD phosphatase-like 1 and splicing factors and is important for pre-mRNA splicing in Arabidopsis. **PLoS Genet**. 9: e1003875.

- Chiang GC, Bartsch M, Barua D, Nakabayashi K, Debieu M, Kronholm I, Koornneef M, Soppe WJ, Donohue K, De Meaux J. 2011. DOG1 expression is predicted by the seed maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Ecol.** 20:3336-49.
- Childs KL, Miller FR, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, Morgan PW, Mullet JE. 1997. The Sorghum Photoperiod Sensitivity Gene, *Ma3*, Encodes a Phytochrome B. **Plant Physiol.** 113: 611-619.
- Collins L, Penny D. 2005. Complex spliceosomal organization ancestral to extant eukaryotes. **Molecular biology and evolution.** 22:1053-1066.
- Côme D & Thêvenot C. 1982. Environmental control of embryo dormancy and germination. The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination, p. 271-298. In: A.A. Khan (ed.). Elsevier Biomedical Press.
- Cone JW y Spruit CJP. 1983. Imbibition conditions and seed dormancy of *Arabidopsis thaliana*. **Physiol. Plant.** 59: 416-420.
- Corbineau F, Belaid D, Côme D. 1992. Dormancy of *Bromus rubens* L. seeds in relation to temperature, light and oxygen effects. **Weed Research.** 32: 303-310.
- Core L J. et al. 2012. Defining the Status of RNA Polymerase at Promoters. **Cell Rep.** 2: 1025-1035.
- Culter S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S, McCourt P. 1996. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. **Science.** 273: 1239-1240.
- Cyrek, M. *et al.* 2016. Seed Dormancy in *Arabidopsis* Is Controlled by Alternative Polyadenylation of DOG1. **Plant Physiol.** 170: 947-55.
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K. & Scheible W.R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology.** 139: 5-17.
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM y Koornneef M. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 122:403-413.
- Del Fueyo P, Sánchez RA, Benech-Arnold RL. 2003. Seed longevity in two sorghum varieties with contrasting dormancy level prior to harvest. **Seed Science and Technology.** 31:639-650.
- Deregibus VA, Casal JJ, Jacobo EJ, Gibson D, Kauffman M, Rodriguez AM. 1994. Evidence that heavy grazing may promote the germination of *Lolium multiflorum* seeds via phytochrome-mediated perception of high red/far-red ratios. **Functional Ecology.** 8:536-542.
- DeRidder BP, Shybut ME, Dyle MC, Kremling KAG, Shapiro MB. 2012. Changes at the 3'-untranslated region stabilize Rubisco activase transcript levels during heat stress in *Arabidopsis*. **Planta.** 236:463-476.

- Derkx M.P.M & Karssen C.M. 1994. Are seasonal dormancy patterns in *Arabidopsis thaliana* regulated by changes in seed sensitivity to light, nitrate and gibberellin. **Annals of Botany**. 73: 129-136.
- Derkx MPM & Karssen CM. 1993a. Variability in light-, gibberellin- and nitrate requirement of *Arabidopsis thaliana* seeds due to harvest time and conditions of dry storage. **J. Plant Physiol**. 141:574–582.
- Derkx MPM y Karssen CM. 1993b. Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellin-deficient and -insensitive mutants. **Physiol. Plant**. 89:360–368.
- Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL. 2011. Mechanisms and Consequences of Alternative Polyadenylation. **Mol. Cell**. 43: 853–866.
- Dill A, Sun T. 2001. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**. 159: 777-785.
- Dill A, Thomas S, Hu J, Steber C, Sun T. 2004. Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. **Plant Cell**. 16: 1392-1405.
- Dixon DP, Hawkins T, Hussey PJ, Edwards R. 2009. Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. **J. Exp. Bot**. 60:1207–1218.
- Dolata, J. *et al.* 2015. NTR1 is required for transcription elongation checkpoints at alternative exons in Arabidopsis. **EMBO J**. 34, 544–558.
- Donohue K., Dorn L., Griffith C., Kim E., Aguilera A., Polisetty C.R. & Schmitt J. 2005. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. **Evolution**. 59: 758-70.
- Eichenberg, K., Henning, L., Martin, A., & Schäfer, E. 2000. Variation in dynamics of phytochrome A in Arabidopsis ecotypes and mutants. **Plant, Cell & Environment**. 23, 311–319.
- Fan J, Niu X, Wang Y, Ren G, Zhuo T, Yang Y, Lu B-R, Liu Y. 2007. Short, direct repeats (SDRs)-mediated post-transcriptional processing of a transcription factor gene *OsVPI* in rice (*Oryza sativa*). **J Exp Bot**. 58: 3811–3817
- Fan J, Niu X, Wang Y, Ren G, Zhuo T, Yang Y, Lu B-R, Liu Y. 2007. Short, direct repeats (SDRs)-mediated post-transcriptional processing of a transcription factor gene *OsVPI* in rice (*Oryza sativa*). **J Exp Bot**. 58: 3811–3817.
- Fankhauser C & Chory J. 1997. Light control of plant development. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**. 13:203–229.
- Farre EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA. 2005. Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock. **Current biology**. 15:47-54.

- Fedak, H. *et al.* 2016. Control of seed dormancy in *Arabidopsis* by a cis-acting noncoding antisense transcript. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 113: E7846–E7855.
- Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong WK, Mockler TC. 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Res.** 20:45–58
- Finch-Savage WE, Cadman CS, Toorop PE, Lynn JR, Hilhorst HW. 2007. Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. **Plant J.** 51: 60-78.
- Finch-Savage WE, Footitt S. 2017. Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. **Journal of Experimental Botany.** 68:843–856.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytol.** 171:501-23.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59:387–415.
- Finkelstein R, Wang M, Lynch T, Rao S, Goodman H. 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an *APETALA 2* domain protein. **Plant Cell.** 10: 1043-1054.
- Finkelstein R. 1994. Mutation at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. **Plant J.** 5: 765-771.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. 2002. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell.** Suppl: S15-S45.
- Foley M.E., Anderson J.V., Chao W.S., Doğramacı M. & Horvath D.P. 2010. Initial changes in the transcriptome of *Euphorbia esula* seeds induced to germinate with a combination of constant and diurnal alternating temperatures. **Plant Molecular Biology.** 73: 131-142.
- Footitt S, Douterelo-Soler I, Clay HA, Finch-Savage WE. 2011. Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 108: 20236-20241.
- Footitt S., Huang Z., Clay H.A., Mead A. & Finch-Savage W.E. 2013. Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. **The Plant Journal.** 74:1003-1015.
- Footitt S., Ölçer-Footitt H., Hambidge A.J. & Finch-Savage W.E. 2017. A laboratory simulation of *Arabidopsis* seed dormancy cycling provides new insight into its regulation by clock genes and the dormancy-related genes *DOG1*, *MFT*, *CIPK23* and *PHYA*. *Plant, Cell & Environment*.
- Fouquet R, Martin F, Fajardo DS, Gault CM, Gomez E, Tseung CW, Policht T, Hueros G, Settles AM. 2011. Maize *rough endosperm3* encodes an RNA splicing factor

- required for endosperm cell differentiation and has a nonautonomous effect on embryo development. **Plant Cell**. 23:4280–4297.
- Frankland B & Taylorson. 1983. Light control of seed germination. In **Encyclopedia of Plant Physiology**, vol. 16^a (ed. W. Shropshire and H. Mor). New York: Springer Verlag.
- Froud-Williams RJ, Drennan DSH, Chancellor RJ. 1984. The influence of burial and dry storage upon cyclic changes in dormancy germination and response to light in seeds of various arable weeds. **New Phytol**. 96:473-481.
- Fu X, Richards D, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd N. 2004. The *Arabidopsis* mutant *sleepy1 gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF SLY1 E3ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. **Plant Cell**. 16: 1406-1418.
- Gagete AP, Riera M, Franco L, Rodrigo MI. 2009. Functional analysis of the isoforms of an ABI3-like factor of *Pisum sativum* generated by alternative splicing. **J Exp Bot**. 60: 1703–1711.
- Gao Y, Liu J, Zhang Z, Sun X, Zhang N, Fan J, Niu X, Xiao F, Liu Y. 2013. Functional characterization of two alternatively spliced transcripts of tomato ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) gene. **Plant Mol Biol**. 82: 131–145
- Gaut BS, Doebley JF. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94:6809–6814.
- Ghersa C.M., Banech-Arnold R.L. & Martínez-Ghersa M.A. 1992. The role of fluctuating temperatures in germination and establishment of *Sorghum halepense*. Regulation of germination at increasing depths. **Functional Ecology**. 6: 460-468
- Giordano C, Sánchez R, Austin A. 2009. Gregarious bamboo flowering opens a window of opportunity for regeneration in a temperate forest of Patagonia. **New Phytologist**. 181: 880–889.
- Giraudat J, Hauge B, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman H. 1992. Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. **Plant Cell**. 4: 1251-1261.
- Gorski T, Gorska K, Rybicki J. 1978. Studies on germination of seeds under leaf canopy. **Flora**. 167: 289–299.
- Graeber K, Linkies A, Müller K, Wunchova A, Rott A, Leubner-Metzger G. 2010. Cross species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. **Plant Mol Biol**. 73:67-87.
- Graeber K, Linkies A, Steinbrecher T, Mummenhoff K, Tarkowská D, Turečková V., ... Leubner-Metzger G. 2014. *DELAY OF GERMINATION 1* mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature- and gibberellin-dependent control of seed germination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 111: 3571-3580.

- Grappin PD, Bouinot B, Sotta E, Miginiac y Jullien M. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: Post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. **Planta**. 210:279–285.
- Groot S, Karssen C. 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**. 171: 525-531.
- Guan LM, Scandalios JG. 2002. Catalase gene expression in response to auxin-mediated developmental signals. **Physiol Plant**. 114:288-295.
- Gubler F, Hughes T, Waterhouse P, Jacobsen, J. 2008. Regulation of seed dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. **Plant Physiology**. 147: 886-896.
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV. 2005. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. **Curr Opin Plant Biol**. 8:183-7.
- Gutierrez L, van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C. 2007. Combined networks regulating seed maturation. **Trends Plant Sci**. 12:294–300.
- Gutiérrez R.A., Stokes T.L., Thum K., Xu X., Obertello M., Katari M.S., ... Coruzzi G.M. 2008. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *CCA1*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105: 4939-4944.
- Haas BJ, Delcher AL, Mount SM, Wortman JR, Smith RK Jr, Hannick LI, Maiti R, Ronning CM, Rusch DB, Town CD, Salzberg SL, White O. 2003. Improving the Arabidopsis genome annotation using maximal transcript alignment assemblies. **Nucleic Acids Res**. 31:5654–5666
- Halliday, KJ, & Whitelam, GC. 2003. Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE. **Plant Physiology**. 131, 1913-1920.
- Harmer, S.L. 2009. The circadian system in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**. 60: 357-377.
- Hartmann L, Drewe-Boß P, Wießner T, Wagner G, Geue S, Lee HC, ..., Wachter A. 2016. Alternative splicing substantially diversifies the transcriptome during early photomorphogenesis and correlates with the energy availability in Arabidopsis. **Plant Cell**. 28: 2715–2734.
- Hasse D, Mikkat S, Hagemann M, Bauwe H. 2009. Alternative splicing produces an H-protein with better substrate properties for the P-protein of glycine decarboxylase. **FEBS J**. 276:6985–6991.
- Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH. 1995. The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. **Plant Mol Biol**. 29:1143-55.
- Hayama R, Coupland G. 2003. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. **Current opinion in plant biology**. 6:13-19.

- He ZS, Xie R, Zou HS, Wang YZ, Zhu HB, Yu GQ. 2007. Structure and alternative splicing of a heat shock transcription factor gene, MsHSF1, in *Medicago sativa*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 364:1056–1061.
- Hedden P & Phillips AL. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science.** 5:523-530.
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schäfer E. 2002. Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. **Plant Physiol.** 128:194-200.
- Hilhorst H. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. **Seed Sci. Res.** 5:61–73.
- Hilhorst HW. 1990. Dose-Response Analysis of Factors Involved in Germination and Secondary Dormancy of Seeds of *Sisymbrium officinale*: I. Phytochrome. **Plant Physiol.** 94:1090-5.
- Hirayama T, Shinozaki K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. **Plant J.** 61:1041–1052.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ. 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. **New Phytol.** 179:33-54.
- Hua W, Li RJ, Zhan GM, Liu J, Li J, Wang XF, Liu GH, Wang HZ. 2012. Maternal control of seed oil content in *Brassica napus*: The role of silique wall photosynthesis. **Plant J.** 69: 432–444.
- Huarte H.R., Luna V., Pagano E.A., Zavala J. & Benech-Arnold R.L. 2014. Fluctuating temperatures terminate dormancy in *Cynara cardunculus* seeds by turning off ABA synthesis and reducing ABA signalling, but not stimulating GA synthesis or signalling. **Seed Science Research.** 24: 79-89.
- Huff, JT., & Zilberman, T. 2012. Regulation of biological accuracy, precision, and memory by plant chromatin organization. **Current Opinion in Genetics and Development.** 22, 132–138.
- Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH. 2004. PHYTOCHROMEINTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. **Science.** 305: 1937–1941.
- Ibarra SE, Auge G, Sánchez RA, Botto JF. 2013. Transcriptional Programs Related to Phytochrome A Function in Arabidopsis Seed Germination. **Mol Plant.** 6, 1261–1273.
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K. 2004. Genome-wide analysis of alternative premRNA splicing in Arabidopsis thaliana based on full-length cDNA sequences. **Nucleic Acids Res.** 32:5096–5103.
- Imaizumi T. 2010. *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. **Current Opinion in Plant Biology.** 13: 83.

- Insausti P, Soriano A, Sánchez RA. 1995. Effects of flood-influenced factors on seed germination of *Ambrosia tenuifolia*. **Oeologia**. 103:127-132.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**. 27:325–333.
- James AB, Syed NH, Bordage S, Marshall J, Nimmo GA, Jenkins GI, Herzyk P, Brown JWS, Nimmo HG. 2012. Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes. **Plant Cell**. 24:961–981.
- Jia F, Rock CD. 2013. MIR846 and MIR842 comprise a cistronic MIRNA pair that is regulated by abscisic acid by alternative splicing in roots of Arabidopsis. **Plant Mol. Biol.** 81:447–460.
- Jones MA, Williams BA, McNicol J, Simpson CG, Brown JWS, Harmer SL. 2012. Mutation of Arabidopsis *SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1* causes circadian clock defects. **Plant Cell**. 24:4066–4082.
- Jung, J. H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., ... Wigge, P.A. 2016. Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. **Science**. 354, 886–889.
- Kalyna M. et al. 2012. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. **Nucleic Acids Res.** 40: 2454–2469.
- Karssen CM. 1982. Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. In “The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination” (AA Khan, Ed). Pp. 243-270. Elsevier, Amsterdam.
- Katari MS, Nowicki SD, Aceituno FF, Nero D, Kelfer J, Thompson LP, Cabello JM, Davidson RS, Goldberg AP, Shasha DE. 2010. VirtualPlant: a software platform to support systems biology research. **Plant physiology**. 152:500-515.
- Kazan K. 2003. Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. **Trends Plant Sci.** 8:468– 471.
- Kendall SL, Hellwege A, Marriot P, Whalley C, Graham IA, Penfield S. 2011. Induction of dormancy in Arabidopsis summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. **Plant Cell**. 23:2568-80.
- Kendrick R, Spruit C, Frankland B. 1969. Phytochrome in seeds of *Amaranthus caudatus*. **Planta**. 88: 293-302.
- Kendrick R, Spruit C. 1977. Phototransformations of phytochrome. **Photochem. And Photobiol.** 26: 201-214.
- Kendrick RE, Hillmann WS. 1971. Aspects of phytochrome decay in etiolated seedlings under continuous illumination. **Am. J. Bot.** 58:424–428.

- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Kishimoto N, Yazaki J, Ishikawa M, Yamada H, Ooka H, ..., Yasunishi A. 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. **Science**. 301:376–379.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. **Curr Opin Plant Biol**. 5:33-6.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen C. 1984. The isolation and characterization of abscísico acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Physiol Plantarum**. 61: 337-383.
- Kornblihtt A R. et al. 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 14: 153–65.
- Kriechbaumer V, Wang PW, Hawes C, Abell BM. 2012. Alternative splicing of the auxin biosynthesis gene YUCCA4 determines its subcellular compartmentation. **Plant J**. 70:292–302.
- Kruk BC & Benesh-Arnold RL. 1998. Seed thermal responses in knotgrass (*Polygonum aviculare*) and purslane (*Portulaca oleracea*): a functional and quantitative analysis for the construction of predictive models. **Weed Science**. 46:83-90.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiha T, Kamiya Y y Nambara E. 2004. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **EMBO J**. 23: 1647-1656.
- Lagarias JC & Lagarias DM. 1989. Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86:5778-5780.
- Lamberto I, Percudani R, Gatti R, Folli C, Petrucco S. 2010. Conserved alternative splicing of Arabidopsis transthyretin-like determines protein localization and S-allantoin synthesis in peroxisomes. **Plant Cell**. 22:1564–1574.
- Laserna MP, Sánchez RA, Botto JF. 2008. Light-related loci controlling seed germination in Ler x Cvi and Bay-0 x Sha recombinant inbred-line populations of *Arabidopsis thaliana*. **Ann Bot**. 102:631-42.
- Lazar G & Goodman HM. 2000. The Arabidopsis splicing factor SR1 is regulated by alternative splicing. **Plant Molecular Biology**. 42:571–581.
- Lee S, Cheng H, King K, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd N, Peng J. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. **Gene Dev**. 16: 646-658.
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E y Marion-Poll, A. 2006. Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **Plant J**. 45: 309-319.
- Leff SE & Rosenfeld MG. 1986. Complex transcriptional units: Diversity in gene expression by alternative sRNA processing. **Annu. Rev. Biochem**. 55, 1091–117.

- Legris, M., Klose, C., Costigliolo, C., Burgie, E., Neme, M., Hiltbrunner, A., ... Casal, J.J. 2016. Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. **Science**. 354, 897-900.
- Leivar P & Quail PH. 2010. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. **Trends Plant Sci**. 16: 19-28.
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris P, Guerrier D, Chedford F, Giraudat J. 1994. Arabidopsis ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. **Science**. 264: 1448-1452.
- Leung J, Merlot S, Giraudat J. 1997. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-SENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. **Plant Cell**. 9: 759-771.
- Lightfoot DJ, Malone KM, Timmis JN, Orford SJ. 2008. Evidence for alternative splicing of MADS-box transcripts in developing cotton fibre cells. **Mol. Genet. Genomics**. 279:75-85.
- Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang HQ, Luan S, Li J, He ZH. 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 110:15485-90.
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC. 2007. Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. **Plant J**. 52:133-46.
- Ljung K, Ostin A, Lioussanne L, Sandberg G. 2001. Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. **Plant Physiol**. 125:464-75.
- Lopato S, Gattoni R, Fabini G, Stevenin J, Barta A. 1999. A novel family of plant splicing factors with a Zn knuckle motif: examination of RNA binding and splicing activities. **Plant Mol Biol**. 39: 761-773.
- Lopez-Molina L, Chua N. 2000. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**. 41: 541-547.
- Mancinelli A, Borthwick H, Hendricks S. 1966. Phytochrome action in tomato-seed germination. **Botanical Gazette**. 127: 1-5.
- Mancinelli A, Yaniv Z, Smith P. 1967. Phytochrome and seed germination. Temperature dependence and relative Pfr levels in the germination of dark-germinating tomato seeds. **Plant Physiology**. 42: 333-337.
- Mancinelli AL, Kendrick RE, Kronenberg GHM. 1994. The physiology of phytochrome actions. **Photomorphogenesis in plants**, eds Kendrick RE, Kronenberg GHM.(Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), 2nd ed. pp 211-270.

- Mancini E, Sanchez SE, Romanowski A, Schlaen RG, Sanchez-Lamas M, Cerdán PD, Yanovsky MJ. 2016. Acute Effects of Light on Alternative Splicing in Light-Grown Plants. **Photochemistry and Photobiology**. 92: 126–133.
- Maraschin S, Memelink J, Offringa R. 2009. Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. **Plant J**. 59:100-9.
- Marden JH. 2008. Quantitative and evolutionary biology of alternative splicing: How changing the mix of alternative transcripts affects phenotypic plasticity and reaction norms. **Heredity**. 100:111–120.
- Marme D, Marchal B, Schäfer E. 1971. A detailed analysis of phytochrome decay and dark reversion in mustard cotyledons. **Planta**. 100:331-336.
- Marquez Y, Brown JW, Simpson C, Barta A, Kalyna M. 2012. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. **Genome Res**. 22:1184–1195
- Marquez Y, Brown JW, Simpson C, Barta A, Kalyna M. 2012. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. **Genome Research**. 22:1184–1195.
- Martin-Trillo M, Grandio EG, Serra F, Marcel F, Rodriguez-Buey ML, Schmitz G, Theres K, Bendahmane A, Dopazo H, Cubas P. 2011. Role of tomato *BRANCHED1-like* genes in the control of shoot branching. **Plant J**. 67:701–714.
- Mastrangelo AM, Marone D, Laido G, de Leonardis AM, de Vita P. 2012. Alternative splicing: Enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. **Plant Sci**. 185:40–49.
- Mathews S, Sharrock R. 1997. Phytochrome gene diversity. **Plant Cell and Environment**. 20: 666-671.
- Mathews S, Sharrock RA. 1996. The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): a phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. **Mol Biol Evol**. 13:1141-50.
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. **Mol. Genet. Genomics**. 283:185–196.
- Matsumura H, Kitajima H, Akada S, Abe J, Minaka N, Takahashi R. 2009. Molecular cloning and linkage mapping of cryptochrome multigene family in soybean. **Plant Genome**. 2:271–281.
- Matsushika A., Makino S., Kojima M. & Mizuno T. 2000. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insight into the plant circadian clock. **Plant Cell Physiology**. 41: 1002-1012.

- Mazzella, MA., Bertero, D., & Casal, JJ. 2000. Temperature - dependent internode elongation in vegetative plants of *Arabidopsis thaliana* lacking phytochrome B and cryptochrome 1. **Planta**. 210, 497-501.
- Mazzucotelli E, Mastrangelo AA, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L. 2008. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Sci**. 174:420-431.
- McClung CR. 2006. Plant circadian rhythms. **The Plant cell**. 18:792-803.
- McGinnis K, Thomas S, Soule J, Strader L, JM Z, Sun T, CM S. 2003. The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. **Plant Cell**. 15:1120-1130.
- McGlinchey NJ, Smith CW. 2008. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? **Trends Biochem Sci**. 33: 385-393.
- McKibbin RS, Wilkinson MD, Bailey PC, Flintham JE, Andrew LM, Lazzeri PA, Gale MD, Lenton JR, and Holdsworth MJ. 2002. Transcripts of Vp-1 homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species. **Proc Natl Acad Sci USA**. 99: 10203-10208.
- Mella R, Burgin M, Sánchez R. 2004. Expansin gene expression in *Datura ferox* L. seeds is regulated by the low- fluence response, but not by the high irradiance response, of phytochromes. **Seed Sci Res**. 14: 61-71.
- Meyer K, Leube M, Grill E. 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. **Science**. 264: 1452-1455.
- Meyer RS, Purugganan MD. 2013. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. **Nat Rev Genet**. 14: 840-852.
- Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. **Plant J**. 45:942-954.
- Min X, Powell B, Braessler J, Meinken J, Yu F, Sablok G. 2015. Genome-wide cataloging and analysis of alternatively spliced genes in cereal crops. **BMC Genomics**. 16: 721.
- Mizoguchi T., Wheatley K., Hanzawa Y., Wright L., Mizoguchi M., Song H.R., ... Coupland G. 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**. 2: 629-641.
- Morelli G, Ruberti I. 2000. Shade avoidance responses: driving auxin along lateral routes. **Plant Physiology**. 122: 621-626.
- Nagasaki H, Arita M, Nishizawa T, Suwa M, Gotoh O. 2005. Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes. **Gene**. 364:53-62.

- Nagel DH, Kay SA. 2012. Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. **Current biology**. 22:R648-657.
- Nagy F, Kircher S, Schäfer E. 2001. Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. **Journal of Cell Science**. 114:475-480.
- Nakabayashi K, Bartsch M, Xiang Y, Miatton E, Pellengahr S, Yano R, Seo M, Soppe WJJ. 2012. The Time Required for Dormancy Release in *Arabidopsis* Is Determined by DELAY OF GERMINATION1 Protein Levels in Freshly Harvested Seeds. **The Plant Cell**. 24: 2826-2838.
- Nakabayashi K, Bartsch M, Ding J, and Soppe WJJ. 2015. Seed Dormancy in *Arabidopsis* Requires Self-Binding Ability of DOG1 Protein and the Presence of Multiple Isoforms Generated by Alternative Splicing. **PLOS Genet**. 11: e1005737.
- Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua NH, Sakakibara H. 2010. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. **The Plant Cell**. 22:594-605.
- Nambara E, Marion-Poll A. 2003. ABA action and interactions in seeds. **Trends Plant Sci**. 8:213-7.
- Neff MM, Street IH, Turk EM, Ward JM. 2006. Interaction of light and hormone signaling to mediate photomorphogenesis. **Photomorphogenesis in plants and bacteria**. Springer. pp 439-473.
- Nemhauser JL, Chory J. 2005. A new FronTIR in targeted protein degradation and plant development. **Cell**. 121:970-2.
- Ner-Gaon H, Halachmi R, Savaldi-Goldstein S, Rubin E, Ophir R, Fluhr R. 2004. Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. **Plant J**. 39:877–885.
- Nozue K, Maloof JN. 2006. Diurnal regulation of plant growth. **Plant, Cell & Environment**. 29:396-408.
- Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G. 2009. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 21: 403-419.
- Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C, Choi G. 2004. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**. 16: 3045-3058.
- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G. 2006. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. **Plant J**. 47: 124-139.
- Oh E., Yamaguchi S., Hu J., Utsuke J., Jung B., Paik I., ... Choi G. 2007. PIL5, a phytochrome-Interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by

- binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. **Plant Cell**. 19: 1192-1208.
- Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. **Plant Cell**. 19:118-30.
- Oliverio KA, Crepy M, Martin-Tryon EL, Milich R, Harmer SL, Putterill J, ... Casal JJ. 2007. GIGANTEA regulates phytochrome A-mediated photomorphogenesis independently of its role in the circadian clock. **Plant Physiology**. 144: 495-502.
- Oliveros JC. 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogpcnbcices/tools/venny/indexhtml> 2007.
- Onodera Y, Haag JR, Ream T, Nunes PC, Pontes O, Pikaard CS. 2005. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. **Cell**. 120: 613-622.
- Palusa SG, Ali GS, Reddy ASN. 2007. Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/ arginine-rich proteins and its regulation by hormones and stresses. **Plant Journal**. 49: 1091–1107.
- Parry G, Estelle M. 2006. Auxin receptors: a new role for F-box proteins. **Curr Opin Cell Biol**. 18:152-6.
- Penfield S & Hall A. 2009. A role for multiple circadian clock genes in the response to signals that break seed dormancy in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. 21: 1722-1732.
- Penfield S, Josse E-M, Halliday KJ. 2010. A role for an alternative splice variant of *PIF6* in the control of *Arabidopsis* primary seed dormancy. **Plant Mol Biol**. 73: 89–95.
- Peng J, Richards D, Moritz T, Caño-Delgado A, Harberd N. 1999. Extragenic suppressors of the *Arabidopsis gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. **Plant Physiol**. 119: 1199-1207.
- Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, Simpson C, Brown JW, Barta A, Kalyna M, Kornblihtt AR. 2014. A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. **Science**. 344: 427–430.
- Pokhilko A, Fernandez AP, Edwards KD, Southern MM, Halliday KJ, Millar AJ. 2012. The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. **Molecular systems biology**. 8:574.
- Pratt H, Cordonnier-Pratt MM, Kelmenson PM, Lazarova GI, Kubota T, Alba RM. 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant, Cell & Environment**. 20: 672–677.
- Probert RJ. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. In: Fenner M, editor. Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. Oxon: CABI Publishing. 261–292.

- Pruneda-Paz J.L., Breton G., Para A. & Kay S.A. 2009. A functional genomics approach reveals CHE as a novel component of the *Arabidopsis* circadian clock. **Science**. 323: 1481–1485.
- Pruneda-Paz JL, Kay SA. 2010. An expanding universe of circadian networks in higher plants. **Trends in plant science**. 15:259-265.
- Puyaubert J, Denis L, Alban C. 2008. Dual targeting of Arabidopsis holocarboxylase synthetase1: A small upstream open reading frame regulates translation initiation and protein targeting. **Plant Physiol**. 146: 478–491.
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D. 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. **Science**. 268:675-80.
- Reddy AS & Shad Ali G. 2011. Plant serine/arginine-rich proteins: roles in precursor messenger RNA splicing, plant development, and stress responses. **Wiley Interdiscip Rev RNA**. 2:875-89.
- Reddy AS. 2007. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. **Annual review of plant biology**. 58:267-294.
- Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, Barta A. 2013. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. **Plant Cell**. 25: 3657–83.
- Reed J.W., Nagatani A., Elich T.D., Fagan M. & Chory J. 1994. Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. **Plant Physiology**. 104: 1139-1149.
- Richards D, King K, Ait-Ait T, Harberd N. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. 52: 67-88.
- Rodríguez-Gacio MC, Matilla-Vázquez MA, Matilla AJ. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on. **Plant Signaling & Behavior**. 4: 1035-49.
- Rosloski SM, Singh A, Jali SS, Balasubramanian S, Weigel D, Grbic V. 2013. Functional analysis of splice variant expression of MADS AFFECTING FLOWERING 2 of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol**. 81:57–69.
- Ruberti I, Sessa G, Lucchetti S, Morelli G. 1991. A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. **The EMBO Journal**. 10: 1787- 1791.
- Sánchez R, de Miguel L. 1997. Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. **Seed Sci Res**. 7: 27-33.
- Sánchez R, Mella R. 2004. **Handbook of seed physiology. Application to agriculture**. Benech-Arnold R, Sánchez R. New York, Food Product Press and The Haworth Press, Inc.: 221-243.

- Sánchez R, Sunell L, Labavitch J, Bonner B. 1990. Changes in endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. **Plant Physiol.** 93: 89-97.
- Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, Cuevas JC, Herz MAG, Depetris-Chauvin A, Simpson CG, et al. 2010. A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. **Nature.** 468:112–116.
- Schäfer E, Bowler C. 2002. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. **EMBO Rep.** 3: 1042–1048.
- Scopel A.L., Ballaré C.L. & Sánchez R.A. 1991. Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. **Plant Cell & Environment.** 14: 501-508.
- Sessa G, Carabelli M, Ruberti I (1994) Identification of distinct families of HD-Zip proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology.** 412–426.
- Severing EI, van Dijk ADJ, Morabito G, Busscher-Lange J, Immink RGH, van Ham R. 2012. Predicting the impact of alternative splicing on plant MADS domain protein function. **PLoS One.** 7:e30524.
- Shang X, Cao Y, Ma L. 2017. Alternative splicing in plant genes: A means of regulating the environmental fitness of plants. **Int. J. Mol. Sci.**
- Sharrock R, Clack T. 2002. Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. **Plant Physiol.** 130: 442-456.
- Sheehan MJ, Kennedy LM, Costich DE, Brutnell TP. 2007. Subfunctionalization of PhyB1 and PhyB2 in the control of seedling and mature plant traits in maize. **Plant Journal.** 49:338–353.
- Sheen J. 1996. Ca²⁺ -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. **Science.** 274: 1900-1902.
- Sheen J. 1998. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. **Proc Natl Acad Sci U S A.**
- Shen Y, Zhou Z, Wang Z, Li W, Fang C, Wu M, et al. 2014. Global dissection of alternative splicing in paleopolyploid soybean. **The Plant Cell.** 26: 996–1008.
- Shi H, Zhong S, Mo X, Liu N, Nezames CD, Deng XW. 2013. HFR1 Sequesters PIF1 to Govern the Transcriptional Network Underlying Light-Initiated Seed Germination in Arabidopsis. **Plant Cell.** 25:3770-84.
- Shichijo C, Katada K, Tanaka O, Hashimoto T. 2001. Phytochrome A-mediated inhibition of seed germination in tomato. **Planta.** 213:764-9.
- Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, Matsushita T. 2014. Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** 111: 18781–18786.

- Shim J.S., Kubota A. & Imaizumi T. 2017. Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in Arabidopsis: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration. **Plant Physiology**. 173: 5-15.
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M. 1996. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 93: 8129-8133.
- Silverstone A, Ciampaglio C, Sun T. 1998. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. **Plant Cell**. 10:155-169.
- Silverstone A, Jung H, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T. 2001. Repressing a repressor: gibberellin- induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 13: 1555-1565.
- Smith CW, Valcarcel J. 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. **Trends in biochemical sciences**. 25:381-388.
- Srinivasan A, Jiménez-Gómez JM, Fornara F, Soppe WJJ, Brambilla V. 2016. Alternative Splicing Enhances Transcriptome Complexity in Desiccating Seeds. **JIPB**. 58: 947–958.
- Staiger D, Brown JW. 2013. Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. **The Plant Cell**. 25:3640-3656.
- Staiger D, Korneli C, Lummer M, Navarro L. 2013. Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. **New Phytol**. 197:394–404.
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. 2005. Function of alternative splicing. **Gene**. 344: 1–20.
- Steindler C, Carabelli M, Borello U, Morelli G, Ruberti I. 1997. Phytochrome A, phytochrome B and other phytochrome(s) regulate *ATHB-2* gene expression in etiolated and green *Arabidopsis* plants. **Plant Cell & Environment**. 20: 759–763.
- Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, ..., Yano M. 2010. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 107:5792–5797.
- Sugliani M, Brambilla V, Clerkx EJM, Koornneef M, and Soppe WJJ. 2010. The conserved splicing factor SUA controls alternative splicing of the developmental regulator ABI3 in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 22: 1936–1946.
- Sun T. & Gubler F. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annu Rev Plant Biol**. 55: 197-223.
- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A, Brown JWS. 2012. Alternative splicing in plants - coming of age. **Trends Plant Sci**. 17:616–623.
- Taiz L, Zeiger E. 1998. Plant Physiology. 2nd. Edition. Sinauer Associates Inc. Pub., Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 793.

- Tanabe N, Yoshimura K, Kimura A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2007. Differential expression of alternatively spliced mRNAs of Arabidopsis SR protein homologs, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. **Plant and Cell Physiology**. 48: 1036–1049.
- Taylorson RB. 1972. Phytochrome controlled changes in dormancy and germination of buried weed seeds. **Weed Science**. 20:417-422.
- Thatcher SR, Zhou W, Leonard A, Wang B- B, Beatty M, Zastrow-Hayes G, et al. 2014. Genome-wide analysis of alternative splicing in Zea mays: Landscape and genetic regulation. **The Plant Cell Online**. 26: 3472–3487.
- Topham A.T., Taylor R.E., Yan D., Nambara E., Johnston I.G. & Bassel G.W. 2017. Temperature variability is integrated by a spatially embedded decision-making center to break dormancy in *Arabidopsis* seeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 114: 6629-6634.
- Turchi L, Carabelli M, Ruzza V, et al. 2013. Arabidopsis HD-Zip II transcription factors control embryo development and meristem function. **Development**. 140, 2118–2129.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. **Science**. 276:1865-8.
- Vázquez-Yañes C & Orozco-Segovia A. 1990. Ecological significance of Light controlled seed germination in two contrasting tropical habitats. **Oecología**. 83:171-175.
- Wachter A, Rühl C, Stauffer E. 2012. The role of polypyrimidine tract-binding proteins and other hnRNP proteins in plant splicing regulation. **Front. Plant Sci**. 3: 81.
- Wang BB, Brendel V (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 103:7175–7180.
- Wang M, Heimovaara-Dijkstra S, Van Duijn B. 1995. Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. **Planta**. 195:586–592.
- Wang Z, Cao H, Sun Y, Li X, Chen F, Carles A, et al. 2013. *Arabidopsis* paired amphipathic helix proteins SNL1 and SNL2 redundantly regulate primary seed dormancy via abscisic acid-ethylene antagonism mediated by histone deacetylation. **Plant Cell**. 25, 149–166.
- Wang Z, Chen F, Li X, Cao H, Ding M, Zhang C, Zuo J, et al. 2016. Arabidopsis seed germination speed is controlled by SNL histone deacetylase-binding factor-mediated regulation of AUX1. **Nat Commun**. 7:13412.
- Watkins J, Cantliffe D, Huber D, Nell T. 1985. Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 110: 61-65.
- Weiss D & Ori N. 2007. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. **Plant Physiology**. 144, 1240-1246.

- Wen C, Chang C. 2002. *Arabidopsis RGL1* encodes a negative regulator of gibberellins responses. **Plant Cell**. 14: 87-100.
- Wilkinson M, Lenton J & Holdsworth M. 2005. Transcripts of *Vp-1* homoeologues are alternatively spliced within the Triticeae tribe. **Euphytica**. 143: 243–246.
- Wiszniewski AA, Smith SM, Bussell JD. 2012. Conservation of two lineages of peroxisomal (Type I) 3-ketoacyl-CoA thiolases in land plants, specialization of the genes in *Brassicaceae*, and characterization of their expression. **I. J. Exp. Bot.** 63:6093–6103.
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. **Ann Bot.** 95:707-35.
- Wu SH. 2014. Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma. **Annu. Rev. Plant Biol.** 65: 311–333.
- Xiao YL, Smith SR, Ishmael N, Redman JC, Kumar N, Monaghan EL, Ayele M, Haas BJ, Wu HC, Town CD. 2005. Analysis of the cDNAs of hypothetical genes on *Arabidopsis* chromosome 2 reveals numerous transcript variants. **Plant Physiol.** 139: 1323–1337.
- Yamaguchi S, Smith M, Brown R, Kamiya Y, Sun T. 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3B -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**. 10: 2115-2126.
- Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y y Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Cell**. 16: 367-378.
- Yanovsky MJ, Kay SA. 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. **Nature**. 419:308-12.
- Zhang Q, Zhang X, Wang S, Tan C, Zhou G, Li C. 2016. Involvement of alternative splicing in barley seed germination. **PLoS One**. 11: 1–13.
- Zhu W, Schlueter SD, Brendel V. 2003. Refined annotation of the *Arabidopsis* genome by complete expressed sequence tag mapping. **Plant Physiol.** 132: 469–484.
- Zoratti L, Karppinen K, Escobar AL, Häggman H, Jaakola L. 2014. Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. **Front. Plant Sci.** 5:534.

CAPÍTULO 7.

ANEXOS.

ANEXOS CAPÍTULO 2.

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EVENTOS DE
SPLICING ALTERNATIVO ASOCIADOS A LA PERCEPCIÓN
POR LUZ ROJA EN SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*.**

Tabla 2.4.1. Análisis de enriquecimiento de las GO.

Categoría Ontológica	Factor de Enriquecimiento	Valor de P	Nº de Genes
<i>Splicing</i> del ARN	SA: 8.54	SA: 0.00672	SA: 6 genes
	DE: 0.91	DE: 0.78	DE: 17 genes
Procesamiento del ARNm	SA: 8.63	SA: 0.00672	SA: 6 genes
	DE: -	DE: -	DE: -
Procesos metabólicos del ARNm	SA: 7.91	SA: 0.00504	SA: 7 genes
	DE: 0.83	DE: 0.88	DE: 19 genes
Respuesta a estímulo por luz	SA: 0.79	SA: 0.81	SA: 3 genes
	DE: 1.53	DE: 0.000479	DE: 149 genes
Respuesta a estímulo por ABA	SA: 1.11	SA: 0.65	SA: 3 genes
	DE: 1.65	DE: 0.000479	DE: 114 genes
Respuesta a temperatura	SA: 1.27	SA: 0.58	SA: 4 genes
	DE: 1.68	DE: 3.01e ⁻⁵	DE: 137 genes

SA: genes regulados por luz R a nivel de *splicing* alternativo. DE: genes diferencialmente afectados por luz R a nivel de expresión génica.

Tabla 2.4.5.1. Listado de *primers* utilizados para medir isoformas de *splicing* alternativo.

GEN	Forward	Reverse
<i>ABI3 spl</i>	TTCCTTTACTTGAATCTCCACC	Rv1: AAGACTTTCTGCAAGAGAAAC
		Rv2: CTCGGTTGTCTTACTTTAACC
<i>DRM1 spl</i>	CTCCAACATCTTTGATAAACC	TTGAGTCACCGCTGTACAAC
<i>PIF6 splice</i>	AAAACGAAATGCAGAAGCGTATAA	TGTCATATAATTGATTGCTTCATCCA
<i>PIF6 spl</i>	TCAACAAGACAACAAAATATGAC	TCATTGATGGTGTAACAAATCTG
<i>RS31</i>	TCGGATCTGGAACGGTTG	CAGTGTCTTTGTAGGCTTCAG
<i>RS31a</i>	AAGTTCGGGAGAGTGAAGCG	TGCTCTTTGAATCGGGGACC
<i>SR30</i>	CATGCGAAAGCTGGAGATG	GGTGAAACTGGAGAATTCGATCTTG
<i>U2AF65</i>	TGCACAGCAGCAAATAGCTT	GGCCTGCCACTGGCTGACCATTGG

ANEXOS CAPÍTULO 3.

**PERFIL TRANSCRIPCIONAL INDUCIDO POR LUZ EN LA
GERMINACION DE SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*: ROL DEL
GEN *ATHB2* y DE LAS AUXINAS.**

Tabla Anexo 3.4.1.1.A. Listado de factores de transcripción Down-regulados en R.

Familia	ATG	logFC	Valor de P
bHLH	AT2G46970	5,95733813	2,8796E-115
bHLH	AT3G62090	5,6214802	2,8925E-290
bHLH	AT1G25310	5,1083891	1,8772E-262
HB	AT4G16780	4,5740609	2,7229E-215
MADS	AT1G77950	4,09137993	2,4297E-167
MYB	AT1G74650	3,93576798	1,91133E-28
bZIP	AT2G41070	3,64196525	8,761E-154
C3H	AT2G25900	3,42160629	8,2797E-144
bZIP	AT3G19290	3,25920579	2,686E-121
NAC	AT1G77450	3,2551063	3,3427E-106
AP2-EREBP	AT1G36060	3,13143865	4,88854E-78
ABI3VP1	AT3G26790	3,11365974	1,0678E-26
AP2-EREBP	AT5G18450	2,98573679	2,0982E-141
HB	AT5G59340	2,96531904	1,3233E-66
AP2-EREBP	AT1G75490	2,95301884	4,78632E-65
Orphans	AT4G27310	2,86472681	1,20143E-46
Tify	AT2G34600	2,86313407	1,63274E-13
C2C2-CO-like	AT5G57660	2,76662316	2,12961E-44
AP2-EREBP	AT5G47220	2,74862632	2,68622E-20
C3H	AT5G07500	2,7083748	1,98518E-15
MYB-related	AT1G18330	2,67479304	1,6097E-124
AP2-EREBP	AT1G28360	2,66237357	1,9693E-35
AP2-EREBP	AT2G41710	2,65300773	3,36233E-96
MYB-related	AT1G01520	2,5965943	1,02319E-53
SWI/SNF-BAF60b	AT3G03590	2,56785558	4,87965E-40
GRAS	AT1G50420	2,52406022	3,5637E-116
AUX/IAA	AT3G62100	2,51721442	2,7023E-35
MYB-related	AT3G10113	2,5073029	3,02417E-61
MYB-related	AT3G09600	2,47300604	2,92557E-83
Orphans	AT4G39070	2,44897853	3,7967E-14
CCAAT	AT1G30500	2,43334645	5,0202E-101
AP2-EREBP	AT1G01250	2,40338668	7,07738E-25
Orphans	AT2G46670	2,37966917	1,04894E-10
MYB-related	AT5G02840	2,36144561	1,0935E-102
FAR1	AT3G07500	2,33935417	4,33159E-70
NAC	AT1G01720	2,31427267	6,29002E-49
FHA	AT5G67030	2,27065449	4,29193E-62
AP2-EREBP	AT1G46768	2,25627353	6,25291E-41
AP2-EREBP	AT5G61590	2,23942656	1,94398E-77
C3H	AT4G29190	2,22221624	8,89076E-25
WRKY	AT1G13960	2,21085037	1,55886E-75
TAZ	AT5G67480	2,20286477	3,49404E-59
C3H	AT1G03790	2,18486093	4,06939E-64
TRAF	AT1G21780	2,17520087	2,95998E-60
Pseudo ARR-B	AT5G02810	2,15831703	1,58075E-67
HSF	AT5G54070	2,15729116	1,3894E-33
TRAF	AT4G26120	2,13903198	3,14138E-27
Pseudo ARR-B	AT5G24470	2,1387478	2,25841E-18
C2C2-CO-like	AT2G47890	2,13817141	3,66072E-71
Orphans	AT2G47890	2,13817141	3,66072E-71
HB	AT2G44910	2,1291699	2,60491E-20
WRKY	AT5G52830	2,11902222	1,04836E-09
Pseudo ARR-B	AT2G46790	2,11718136	6,92218E-11
Orphans	AT2G46790	2,11718136	6,92218E-11
LOB	AT4G00220	2,07690858	3,57461E-13
CAMTA	AT4G16150	2,06387671	3,06128E-58
TRAF	AT3G48360	2,05999513	3,24907E-13

TRAF	AT2G46260	2,04451321	1,51881E-59	MADS	AT5G65070	1,77370023	5,38654E-50
AP2-EREBP	AT4G36900	2,04285464	7,37086E-24	WRKY	AT2G23320	1,76762922	2,42681E-24
HMG	AT3G51880	2,04000871	5,54657E-57	bZIP	AT1G49720	1,7671919	9,22316E-45
HMG	AT1G20693	2,0387902	6,08651E-64	LOB	AT1G67100	1,75539279	6,81903E-41
AP2-EREBP	AT5G61600	2,03430554	9,94765E-38	Tify	AT4G14720	1,75122194	1,84453E-46
GRAS	AT2G29060	2,03319136	3,04498E-32	G2-like	AT2G20400	1,73626187	8,83999E-49
CCAAT	AT5G54640	1,9969658	1,81197E-57	G2-like	AT1G68670	1,73288535	1,02294E-46
C3H	AT5G44260	1,98897784	1,42434E-61	HB	AT2G46680	1,70442314	5,49614E-15
SNF2	AT5G20420	1,98787118	2,21197E-24	C3H	AT5G42820	1,70418071	4,55844E-34
MYB	AT4G37260	1,98150959	2,95791E-52	WRKY	AT2G38470	1,69953743	8,64971E-26
Pseudo ARR-B	AT5G60100	1,96480415	8,04865E-67	bZIP	AT1G03970	1,68928852	1,65899E-48
AP2-EREBP	AT3G16770	1,95487824	1,42867E-35	Trihelix	AT5G05550	1,68822792	2,64715E-32
HSF	AT4G18880	1,94654864	1,86872E-28	bZIP	AT1G43700	1,67485909	2,11458E-47
Orphans	AT4G27900	1,93892323	2,16969E-68	GRAS	AT1G07530	1,67196485	1,18753E-44
MADS	AT5G10140	1,92187127	2,28307E-59	bHLH	AT1G01260	1,66457107	2,29921E-35
bZIP	AT4G01120	1,9103015	3,79372E-71	Pseudo ARR-B	AT5G61380	1,66037835	9,63031E-47
NAC	AT3G44290	1,90049971	1,75387E-61	bZIP	AT5G65210	1,65992455	2,90872E-33
MYB-related	AT2G13960	1,87464969	5,06627E-10	bHLH	AT3G19860	1,65813851	1,011E-42
PLATZ	AT1G76590	1,85082898	9,37699E-44	NAC	AT5G22290	1,65394636	3,84824E-43
C2H2	AT5G66730	1,85061775	2,25047E-47	ABI3VP1	AT2G35310	1,64077265	1,72533E-52
bHLH	AT1G69010	1,84970724	8,94442E-59	TUB	AT3G06380	1,62614478	1,29014E-45
GNAT	AT2G39000	1,84916448	1,06166E-55	MBF1	AT3G24500	1,60965568	7,73058E-20
BBR/BPC	AT2G35550	1,84805484	1,59287E-28	SWI/SNF-BAF60b	AT5G08430	1,60844052	1,27572E-46
NAC	AT4G27410	1,84664513	1,88788E-14	TRAF	AT1G01640	1,59452191	1,44283E-08
AP2-EREBP	AT3G54320	1,83128296	1,3705E-12	MYB-related	AT5G37260	1,58583	1,36491E-41
Orphans	AT1G68190	1,82591137	4,57474E-32	Trihelix	AT3G10030	1,58316897	1,26743E-37
CAMTA	AT1G67310	1,79904476	9,25859E-46	NAC	AT5G63790	1,58220332	6,9429E-16
G2-like	AT3G46640	1,79324144	4,26573E-55	MYB-related	AT1G72650	1,57756548	2,11279E-37
C2H2	AT2G01940	1,79203228	1,32562E-31	NAC	AT4G35580	1,57439128	7,39241E-39
MYB-related	AT4G01280	1,78672019	2,60429E-59	HSF	AT3G02990	1,56009202	1,43482E-37

SNF2	AT2G44980	1,55379202	2,31363E-30	EIL	AT3G20770	1,35073381	2,03788E-28
DBP	AT3G62260	1,55245745	4,42492E-18	CCAAT	AT5G12840	1,34828945	2,81179E-30
C2H2	AT1G27730	1,55214503	7,45093E-14	ABI3VP1	AT4G33280	1,3376641	1,49421E-08
FHA	AT3G20550	1,52727232	1,25235E-39	SNF2	AT3G57300	1,33335916	4,83112E-24
AUX/IAA	AT1G04100	1,52211553	1,27431E-07	bZIP	AT2G40950	1,32975256	2,66196E-37
PLATZ	AT1G32700	1,51581986	1,76807E-22	HSF	AT5G16820	1,32864353	4,53464E-28
GRAS	AT1G21450	1,51331003	1,16652E-36	SBP	AT3G15270	1,31790837	1,03349E-05
G2-like	AT5G18240	1,50647244	1,51824E-13	CAMTA	AT3G16940	1,30517266	7,18887E-29
CCAAT	AT5G38140	1,47860152	4,45744E-23	Orphans	AT1G75540	1,30182144	3,80469E-27
VOZ	AT2G42400	1,47682789	1,08984E-44	CCAAT	AT1G56170	1,29963748	1,47297E-21
Orphans	AT2G17820	1,47487809	2,67274E-22	SNF2	AT2G16390	1,29857325	8,16535E-23
C2H2	AT5G04340	1,4676236	3,99841E-14	GRAS	AT2G04890	1,29388613	1,66998E-27
AP2-EREBP	AT1G78080	1,45596759	1,9763E-27	AP2-EREBP	AT1G71130	1,29113499	1,6151E-14
C2C2-Dof	AT5G39660	1,45208881	1,50601E-31	Orphans	AT1G78600	1,28405347	4,05179E-26
G2-like	AT5G29000	1,45027443	4,23183E-26	HSF	AT3G24520	1,27670316	5,54457E-34
SNF2	AT5G05130	1,44828524	8,2064E-29	WRKY	AT2G03340	1,27139649	9,14924E-33
MYB	AT3G12820	1,44753123	2,94089E-05	MYB-related	AT5G58340	1,26782622	6,65611E-13
bZIP	AT4G36730	1,44673607	1,13847E-33	HSF	AT2G26150	1,26615843	5,0438E-09
MYB-related	AT1G17520	1,44176274	7,67842E-37	HSF	AT5G45710	1,25124035	5,89244E-21
TUB	AT2G18280	1,42377797	4,6146E-31	G2-like	AT4G37180	1,24916141	2,64443E-28
BBR/BPC	AT2G01930	1,41160819	1,08392E-39	C2C2-CO-like	AT3G02380	1,24855506	1,25606E-11
C3H	AT2G47850	1,39864451	2,57924E-38	PHD	AT4G39100	1,24824582	4,00773E-30
MYB	AT1G09770	1,38645322	4,86864E-26	G2-like	AT2G02060	1,24202919	1,60581E-07
MADS	AT2G34440	1,38250315	2,14103E-07	bHLH	AT3G47640	1,2400572	1,07066E-25
CCAAT	AT3G20910	1,38043577	6,63685E-36	Alfin-like	AT5G20510	1,23924607	4,02448E-25
AUX/IAA	AT1G15050	1,37744305	0,001915442	C2H2	AT3G19580	1,2384553	2,40855E-10
bHLH	AT5G46760	1,37735538	3,84573E-24	mTERF	AT1G78930	1,23080845	5,84279E-28
bZIP	AT2G36270	1,36692541	5,305E-29	G2-like	AT5G59570	1,22515799	3,49493E-22
AP2-EREBP	AT4G06746	1,36208251	2,94578E-15	C2C2-CO-like	AT5G24930	1,22253088	4,29142E-23
MADS	AT1G18750	1,3578928	1,41085E-16	SWI/SNF-BAF60b	AT4G22360	1,22132939	1,04317E-29

HMG	AT1G20696	1,21196935	1,02559E-21	AP2-EREBP	AT5G64750	1,12596173	3,32833E-15
GRF	AT4G24150	1,2091798	3,28253E-24	ARID	AT1G76510	1,11975712	2,38392E-24
TUB	AT1G53320	1,20436652	8,86037E-24	GeBP	AT4G00270	1,11780304	1,16064E-19
AP2-EREBP	AT1G22190	1,20262331	8,48188E-18	bZIP	AT2G21230	1,11597804	2,33858E-22
MADS	AT5G65080	1,19885757	7,0806E-21	AP2-EREBP	AT5G10510	1,11014676	2,53488E-21
C3H	AT2G19810	1,19551066	8,77873E-25	FHA	AT5G19280	1,10808891	4,34875E-18
MYB-related	AT1G09710	1,19368652	1,22822E-21	mTERF	AT1G61970	1,09470994	1,27381E-12
Trihelix	AT3G11100	1,18988574	1,27112E-22	HB	AT4G00730	1,09424418	1,42752E-17
Trihelix	AT1G13450	1,18340964	1,46279E-29	CCAAT	AT4G14540	1,09365425	0,000919931
bZIP	AT4G02640	1,17678942	1,36369E-26	BES1	AT1G78700	1,09161457	5,31222E-20
PHD	AT1G32810	1,17613148	6,96995E-23	MYB-related	AT4G16420	1,08945315	8,3626E-24
MYB-related	AT3G07740	1,17440713	7,02186E-27	BBR/BPC	AT5G42520	1,08117893	4,26623E-21
AP2-EREBP	AT4G17500	1,17125979	2,23267E-09	Trihelix	AT5G47660	1,07763979	2,12827E-17
bZIP	AT3G10800	1,17089381	8,77813E-28	GNAT	AT1G18335	1,07206021	2,71465E-14
bZIP	AT2G46270	1,16638253	5,89639E-24	NAC	AT5G08790	1,06907847	2,26403E-08
C2H2	AT1G34370	1,16443588	8,68259E-19	LIM	AT3G55770	1,06774604	3,92792E-20
FAR1	AT1G52520	1,15842493	9,79662E-15	SBP	AT1G69170	1,06709817	1,30891E-08
BSD	AT3G61420	1,15492857	3,77052E-19	SET	AT4G13460	1,06579268	2,38947E-19
RWP-RK	AT4G24020	1,15481419	2,37948E-24	PLATZ	AT1G21000	1,06543015	5,23596E-19
WRKY	AT4G30935	1,15405214	8,43294E-21	bHLH	AT2G24260	1,06494111	1,20027E-17
C3H	AT1G27650	1,1510833	1,38194E-20	PHD	AT1G33420	1,05946118	6,92283E-23
BBR/BPC	AT2G21240	1,14788509	7,70907E-28	AP2-EREBP	AT2G23340	1,05439795	2,77451E-06
bHLH	AT5G38860	1,144074	6,55436E-29	GRAS	AT1G50600	1,05406359	3,29991E-18
FHA	AT2G45460	1,14406346	2,09216E-26	C2C2-Dof	AT4G00940	1,05367914	0,000340116
MBF1	AT3G58680	1,13888189	1,64818E-21	C3H	AT3G55980	1,04840862	2,1026E-10
C2C2-Dof	AT5G60850	1,13504445	3,83613E-10	MYB	AT5G02320	1,04642027	1,96757E-09
AP2-EREBP	AT1G22985	1,13208852	2,08994E-11	bHLH	AT1G10610	1,0402659	3,84925E-13
TUB	AT5G18680	1,13186286	8,38245E-24	TUB	AT1G76900	1,03627724	2,0604E-20
AUX/IAA	AT4G28640	1,13104576	4,058E-13	MED7	AT5G03500	1,03037793	4,51898E-15
SNF2	AT1G05120	1,12888477	4,49105E-23	bZIP	AT2G16770	1,0290244	7,45818E-16

C2C2-Dof	AT3G47500	1,02470732	2,42516E-06
WRKY	AT5G26170	1,01491634	3,46916E-07
GRAS	AT3G46600	1,01304777	1,90808E-14
CAMTA	AT2G22300	1,00435339	1,03871E-19

Tabla Anexo 3.4.1.1.B. Listado de factores de transcripción Up-regulados en R.

Familia	ATG	logFC	valor de P				
MYB-related	AT1G01060	-2,07084147	4,516E-64	Trihelix	AT1G33240	-2,24095125	1,267E-70
MYB-related	AT1G01380	-2,01124349	6,209E-08	AP2-EREBP	AT1G44830	-2,87189639	8,58E-13
GNAT	AT1G03150	-1,19297888	6,641E-20	MADS	AT1G47760	-2,43244169	2,49E-13
ARID	AT1G04880	-1,00109334	0,0005014	CCAAT	AT1G51060	-1,46701459	2,076E-38
HB	AT1G05230	-1,54710292	2,07E-23	bHLH	AT1G51070	-2,40618899	7,112E-68
bHLH	AT1G05805	-2,67363552	2,617E-14	AP2-EREBP	AT1G51190	-1,09685589	4,716E-05
Orphans	AT1G06040	-1,10961412	2,419E-17	HB	AT1G52150	-1,00519095	3,095E-15
bZIP	AT1G06850	-1,23094837	4,269E-08	AP2-EREBP	AT1G53170	-1,83267507	6,154E-07
C2C2-Dof	AT1G07640	-1,74704835	1,588E-08	CCAAT	AT1G54690	-1,34936927	1,869E-22
Sigma70-like	AT1G08540	-1,42612392	6,825E-31	TRAF	AT1G55760	-2,16181525	1,585E-10
LIM	AT1G10200	-1,50240752	9,268E-30	bHLH	AT1G59640	-1,37071983	3,252E-22
Orphans	AT1G10470	-1,30347398	2,483E-07	GeBP	AT1G61730	-1,12702716	1,071E-27
AP2-EREBP	AT1G12890	-1,16510735	0,0001299	mTERF	AT1G62110	-1,28957809	3,709E-15
SET	AT1G14030	-1,34811561	2,559E-31	mTERF	AT1G62150	-1,17127521	9,11E-15
MYB	AT1G14350	-1,46405958	6,141E-13	bHLH	AT1G63650	-1,45052823	2,141E-28
zf-HD	AT1G14440	-2,80110938	1,881E-80	C2C2-Dof	AT1G64620	-1,40437973	2,247E-08
C2H2	AT1G14580	-1,12164597	2,302E-14	Sigma70-like	AT1G64860	-1,9983735	1,269E-14
HB	AT1G17920	-1,26277309	1,806E-11	LOB	AT1G65620	-2,40543554	8,348E-23
Tify	AT1G19180	-1,63432655	9,814E-23	C2H2	AT1G66140	-1,11709527	4,907E-05
BES1	AT1G19350	-1,17323331	5,598E-14	GRAS	AT1G66350	-2,8910673	9,9E-24
MADS	AT1G22590	-1,27209973	7,421E-11	bHLH	AT1G66470	-2,86048849	4,963E-17
MYB	AT1G22640	-1,80946574	1,107E-32	BBR/BPC	AT1G68120	-1,08824225	0,0005488
C2H2	AT1G24625	-3,62144825	4,64E-29	C2H2	AT1G68130	-1,29041214	1,038E-10
bHLH	AT1G26260	-1,4736212	5,795E-29	AP2-EREBP	AT1G68550	-1,01700279	3,697E-19
HB	AT1G27050	-1,05067682	2,622E-16	bZIP	AT1G68640	-1,28470532	2,707E-12
WRKY	AT1G29280	-2,84395291	3,735E-09	BSD	AT1G69030	-1,65958905	1,439E-13
LOB	AT1G31320	-1,10697868	1,161E-06	NAC	AT1G69490	-2,05030608	2,293E-18
				G2-like	AT1G69580	-1,42997924	9,443E-09
				MYB-related	AT1G70000	-1,97916652	6,194E-40
				AP2-EREBP	AT1G72570	-1,38969762	6,399E-26

bHLH	AT1G74500	-2,2117639	5,804E-20	SWI/SNF-BAF60b	AT2G35605	-1,07636492	6,655E-20
zf-HD	AT1G74660	-3,10396208	7,847E-09	E2F-DP	AT2G36010	-2,01613709	2,453E-18
BES1	AT1G75080	-1,38280197	1,59E-13	OFP	AT2G36026	-1,04217622	0,0009851
bZIP	AT1G75390	-1,26575845	4,159E-22	OFP	AT2G36050	-3,73940182	2,995E-20
C2H2	AT1G75710	-1,57161962	7,411E-16	Sigma70-like	AT2G36990	-1,21173991	4,463E-26
ARID	AT1G76110	-1,4151625	3,563E-07	WRKY	AT2G37260	-1,84416728	6,439E-12
NAC	AT1G79580	-1,01788231	1,432E-10	C2C2-Dof	AT2G37590	-1,36771092	1,885E-06
HB	AT1G79840	-1,02195286	1,882E-07	MYB	AT2G37630	-1,0595515	2,735E-12
ARR-B	AT2G01760	-1,37099157	3,227E-05	MYB	AT2G39880	-3,03722975	4,415E-18
C2H2	AT2G02070	-1,2042426	4,521E-20	LIM	AT2G39900	-2,0722249	1,164E-14
zf-HD	AT2G02540	-1,15989316	1,323E-06	AP2-EREBP	AT2G40220	-2,36036204	5,235E-79
PBF-2-like	AT2G02740	-1,04028079	5,419E-23	G2-like	AT2G40260	-2,76439487	5,825E-22
PLATZ	AT2G12646	-2,3672938	3,523E-10	G2-like	AT2G40970	-2,4954279	4,245E-15
HB	AT2G16400	-2,22501587	1,206E-33	C3H	AT2G41900	-2,28617917	2,768E-56
HMG	AT2G17560	-1,41088999	5,347E-35	C2H2	AT2G41940	-2,4977218	6,281E-14
bZIP	AT2G18160	-1,78212355	1,021E-22	G2-like	AT2G42660	-1,81365011	2,513E-19
C2C2-GATA	AT2G18380	-2,25145555	9,563E-09	bHLH	AT2G43140	-1,85694724	3,33E-07
G2-like	AT2G20570	-1,52284552	5,69E-13	AP2-EREBP	AT2G44940	-2,35267673	9,963E-13
FHA	AT2G21530	-2,31548989	2,632E-10	C2C2-GATA	AT2G45050	-1,48564305	4,523E-06
bHLH	AT2G22770	-2,70984772	3,018E-90	C2C2-YABBY	AT2G45190	-1,76591148	3,412E-62
SET	AT2G23380	-1,60810958	3,683E-35	MYB-related	AT2G46410	-1,2199969	1,183E-06
WRKY	AT2G24570	-1,42359355	2,643E-28	ARF	AT2G46530	-1,3251278	2,566E-12
C2C2-CO-like	AT2G24790	-2,58064002	3,025E-45	C2C2-Dof	AT2G46590	-1,29150408	5,813E-06
Orphans	AT2G24790	-2,58064002	3,025E-45	MYB-related	AT2G46830	-1,41088755	1,141E-18
C2C2-YABBY	AT2G26580	-2,96785552	3,747E-39	AP2-EREBP	AT2G47520	-4,05343341	1,307E-22
C2H2	AT2G28200	-2,48683797	4,156E-14	NAC	AT3G01600	-1,50220957	5,105E-07
C2C2-Dof	AT2G28510	-3,37911047	1,12E-117	LOB	AT3G02550	-2,64225363	1,945E-91
AP2-EREBP	AT2G28550	-1,36415227	1,263E-08	C3H	AT3G02830	-2,8799138	4,374E-19
OFP	AT2G32100	-1,11021603	0,0014089	GNAT	AT3G02980	-1,8175737	3,992E-06
MYB	AT2G32460	-1,19354469	3,703E-24	NAC	AT3G04060	-2,23537958	1,735E-11

NAC	AT3G04070	-2,77802372	5,246E-21	C2H2	AT3G57670	-1,15644368	3,424E-05
SET	AT3G04380	-2,16302074	1,034E-14	C2H2	AT3G58070	-4,31901914	4,12E-32
Orphans	AT3G04580	-1,03264307	1,488E-19	bZIP	AT3G58120	-4,14325079	2,727E-29
AUX/IAA	AT3G04730	-2,96872018	1,621E-30	HB	AT3G60390	-1,47667739	4,133E-18
CCAAT	AT3G05690	-1,92750572	4,068E-35	GRAS	AT3G60630	-1,00884809	3,743E-10
C2C2-GATA	AT3G06740	-1,06114077	6,127E-06	HB	AT3G61890	-3,95529113	1,913E-27
GRF	AT3G13960	-1,45178131	4,141E-32	GRAS	AT4G00150	-2,03315169	5,424E-16
PHD	AT3G14740	-3,4735324	2,556E-25	C2C2-YABBY	AT4G00180	-1,30874785	6,338E-26
AP2-EREBP	AT3G15210	-1,02838783	2,369E-09	bHLH	AT4G00480	-2,0894039	3,984E-30
C2C2-GATA	AT3G16870	-1,32659156	1,378E-27	mTERF	AT4G02990	-1,18606262	5,701E-24
NAC	AT3G17730	-2,37458011	7,102E-10	AP2-EREBP	AT4G11140	-1,10911443	4,658E-16
C3H	AT3G19360	-1,57720203	6,451E-32	C2H2	AT4G16610	-1,22679261	0,0004931
PHD	AT3G20280	-1,46353904	5,431E-15	C2H2	AT4G17810	-1,71730125	3,506E-13
AP2-EREBP	AT3G20310	-1,00818945	8,949E-15	bHLH	AT4G17880	-1,89796951	3,361E-35
AP2-EREBP	AT3G20840	-1,86871826	1,637E-13	TCP	AT4G18390	-1,55875678	8,158E-34
bHLH	AT3G22100	-2,58841072	4,69E-17	GNAT	AT4G19985	-2,43117034	3,658E-25
Orphans	AT3G23150	-1,29703864	3,031E-18	Orphans	AT4G21430	-1,07654699	6,577E-07
bHLH	AT3G23210	-1,74138999	1,316E-16	AP2-EREBP	AT4G23750	-1,97504147	2,141E-66
NAC	AT3G29035	-3,31501588	2,682E-20	Orphans	AT4G25990	-1,00502481	2,447E-17
SNF2	AT3G42670	-1,45128233	7,825E-29	SWI/SNF-BAF60b	AT4G26810	-1,09952422	3,474E-19
C2C2-Dof	AT3G45610	-1,13246286	3,254E-05	AP2-EREBP	AT4G27950	-1,31481244	1,019E-10
C2H2	AT3G48430	-1,02111204	7,389E-21	ULT	AT4G28190	-1,45686468	3,387E-14
C3H	AT3G48440	-2,04686937	1,718E-34	bHLH	AT4G28790	-1,04301384	6,726E-11
bHLH	AT3G50330	-3,91466808	3,786E-47	SET	AT4G30860	-3,006547	2,47E-20
BES1	AT3G50750	-3,18546824	2,393E-44	bHLH	AT4G30980	-1,78683681	5,304E-11
C2C2-GATA	AT3G51080	-1,60170752	1,823E-10	ABI3VP1	AT4G31650	-1,36442195	9,18E-10
PHD	AT3G53680	-1,08729293	7,167E-07	bZIP	AT4G34000	-2,36566333	2,408E-18
SRS	AT3G54430	-1,31752573	2,267E-12	SWI/SNF-BAF60b	AT4G34290	-1,45025543	1,511E-26
C2C2-GATA	AT3G54810	-1,04216746	3,808E-08	bHLH	AT4G34530	-1,35749277	1,862E-30
C2C2-Dof	AT3G55370	-1,01902611	1,02E-05	bZIP	AT4G34590	-3,05022219	4,316E-48

C2C2-GATA	AT4G34680	-1,90171296	8,83E-37	HB	AT5G15150	-3,85411308	2,855E-51
MYB	AT4G34990	-1,10618506	6,671E-06	C3H	AT5G16540	-2,03010161	4,172E-12
CSD	AT4G36020	-1,12548784	1,053E-25	G2-like	AT5G16560	-1,56405877	2,633E-20
C2C2-GATA	AT4G36240	-3,41788493	7,516E-19	NAC	AT5G18300	-2,09668385	4,54E-09
bHLH	AT4G36540	-1,28250429	2,622E-07	CCAAT	AT5G19490	-1,24258744	1,474E-12
AP2-EREBP	AT4G36920	-2,45887866	1,976E-15	HMG	AT5G23420	-1,14770812	9,233E-16
bHLH	AT4G36930	-1,5918315	3,241E-30	mTERF	AT5G23930	-1,27831969	1,629E-07
GNAT	AT4G37580	-1,22455049	5,574E-28	PHD	AT5G24330	-2,8564748	4,361E-20
GRAS	AT4G37650	-2,14800406	7,169E-26	C2C2-GATA	AT5G25830	-2,91248224	1,701E-12
GRF	AT4G37740	-1,20468158	1,612E-24	NAC	AT5G39610	-1,61971393	2,36E-11
AP2-EREBP	AT4G37750	-2,33907923	2,705E-17	zf-HD	AT5G39760	-2,23854238	4,62E-35
mTERF	AT4G38160	-1,7234443	1,049E-58	NAC	AT5G39820	-2,85806991	2,091E-18
HB	AT4G40060	-3,5075565	2,79E-109	zf-HD	AT5G42780	-1,01803938	0,0002142
OFP	AT5G01840	-2,89793879	2,453E-14	C2H2	AT5G43170	-1,59507354	1,607E-11
C2H2	AT5G03150	-1,51080155	3,25E-27	CCAAT	AT5G43250	-2,32915151	7,536E-14
OFP	AT5G04820	-2,15569617	9,331E-15	AUX/IAA	AT5G43700	-1,78244742	1,977E-32
ABI3VP1	AT5G06250	-3,25678161	3,128E-37	AP2-EREBP	AT5G44210	-1,7883594	2,459E-13
Jumonji	AT5G06550	-1,11621235	2,957E-24	G2-like	AT5G45580	-1,47947387	0,0001383
AP2-EREBP	AT5G07580	-1,65198998	1,979E-09	bHLH	AT5G46690	-2,71784699	3,779E-24
NAC	AT5G07680	-2,69687491	8,011E-35	PLATZ	AT5G46710	-1,74486729	1,917E-13
TCP	AT5G08070	-1,06929296	0,0002222	HB	AT5G46880	-1,25620033	1,402E-11
bHLH	AT5G09750	-3,42801747	5,409E-12	TCP	AT5G51910	-1,50335773	3,022E-15
MYB	AT5G10280	-2,5902857	1,061E-14	C2H2	AT5G52010	-1,4971611	1,342E-21
C3H	AT5G12850	-1,24855557	1,648E-26	MYB-related	AT5G53200	-1,4239835	1,084E-06
TRAF	AT5G13060	-2,77231786	4,375E-18	bHLH	AT5G53210	-2,13154833	2,217E-09
NAC	AT5G13180	-2,44485217	2,517E-28	AP2-EREBP	AT5G53290	-2,10941605	2,028E-50
Sigma70-like	AT5G13730	-2,57582102	4,408E-28	mTERF	AT5G54180	-1,23234785	1,484E-13
NAC	AT5G14000	-1,76687789	7,222E-14	C2C2-GATA	AT5G56860	-1,70983769	3,359E-24
MYB	AT5G14750	-3,09753475	4,238E-64	Orphans	AT5G57180	-3,11093858	1,166E-96
Orphans	AT5G15030	-1,50860505	7,01E-23	MYB	AT5G58900	-3,06710856	4,633E-57

AP2-EREBP	AT5G60120	-1,05716551	1,738E-13
C2C2-Dof	AT5G60200	-1,41815793	1,159E-19
MYB	AT5G60890	-3,67389631	4,9E-121
Trihelix	AT5G63420	-1,364567	2,167E-20
CCAAT	AT5G63470	-1,13447861	4,354E-11
NAC	AT5G64060	-1,81224	5,416E-16
HB	AT5G65310	-2,25209387	5,096E-61
bHLH	AT5G65640	-1,7414025	1,492E-55
C3H	AT5G66270	-2,92624498	6,91E-25
GRAS	AT5G66770	-1,31595293	2,446E-19
bHLH	AT5G67060	-3,40106386	1,845E-38
bHLH	AT5G67110	-2,55958322	1,106E-64
LOB	AT5G67420	-2,44876697	2,166E-11

Tabla Anexo 3.4.2.1.1.A. Listado de genes de auxinas Down-regulados en R.

Ontología	ATG	logFC	Valor de P
Homeostasis	At4g37390	2,76625255	9,67055E-58
Homeostasis	At5g06140	1,26548165	2,43788E-28
Homeostasis	At5g48930	1,6436444	7,10108E-39
Procesos metabólicos	At1g08980	1,53125423	1,87327E-24
Procesos metabólicos	At1g44350	1,51743027	1,674E-35
Procesos metabólicos	At3g02875	2,32108586	2,11274E-75
Procesos metabólicos	At3g44300	1,23167752	0,000184606
Procesos metabólicos	At5g20960	2,42427577	5,59646E-69
Respuesta a auxina	At1g04100	1,52211553	1,27431E-07
Respuesta a auxina	At1g10210	2,25471846	2,56143E-42
Respuesta a auxina	At1g15050	1,37744305	0,001915442
Respuesta a auxina	At1g16510	2,71675437	3,42449E-25
Respuesta a auxina	At1g17520	1,44176274	7,67842E-37
Respuesta a auxina	At1g59870	1,1254531	7,63711E-13
Respuesta a auxina	At2g20120	1,11934843	8,23477E-24
Respuesta a auxina	At2g22240	2,11340014	8,54436E-48
Respuesta a auxina	At2g45210	3,41281747	4,37124E-67
Respuesta a auxina	At3g09600	2,47300604	2,92557E-83
Respuesta a auxina	At3g12955	1,93452001	3,98608E-35
Respuesta a auxina	At3g26790	3,11365974	1,0678E-26
Respuesta a auxina	At3g48360	2,05999513	3,24907E-13
Respuesta a auxina	At3g60690	2,69810767	1,98646E-38
Respuesta a auxina	At3g61900	1,86012364	2,25183E-43
Respuesta a auxina	At3g62100	2,51721442	2,7023E-35
Respuesta a auxina	At4g01280	1,78672019	2,60429E-59
Respuesta a auxina	At4g16420	1,08945315	8,3626E-24
Respuesta a auxina	At4g16780	4,5740609	2,7229E-215

Respuesta a auxina	At4g18710	1,06495579	2,32475E-19
Respuesta a auxina	At4g28640	1,13104576	4,058E-13
Respuesta a auxina	At5g02840	2,36144561	1,0935E-102
Respuesta a auxina	At5g20990	1,07851017	1,77424E-21
Respuesta a auxina	At5g37260	1,58583	1,36491E-41
Respuesta a auxina	At5g45710	1,25124035	5,89244E-21
Respuesta a auxina	At5g67480	2,20286477	3,49404E-59
Transporte polar	At3g63420	1,23240434	1,56277E-13
Transporte polar	At5g13930	1,06093967	0,004240869

Tabla Anexo 3.4.2.1.1.B. Listado de genes de auxinas Up-regulados en R.

Ontología	ATG	log FC	Valor de P
Procesos metabólicos	At5g56660	-1,01276111	8,1446E-11
Procesos metabólicos	At1g05470	-1,16240279	1,7436E-06
Procesos metabólicos	At2g20610	-1,21806192	1,731E-27
Procesos metabólicos	At1g70560	-2,24832271	7,3629E-20
Procesos metabólicos	At4g31500	-2,79390318	1,1398E-57
Procesos metabólicos	At4g39950	-3,35557106	7,825E-64
Respuesta a auxina	At2g37630	-1,0595515	2,7345E-12
Respuesta a auxina	At4g37580	-1,22455049	5,5741E-28
Respuesta a auxina	At2g46830	-1,41088755	1,1406E-18
Respuesta a auxina	At2g42580	-1,41861585	2,0674E-18
Respuesta a auxina	At1g75500	-1,4802343	9,4604E-26
Respuesta a auxina	At1g29420	-1,4955254	1,0776E-13
Respuesta a auxina	At2g34680	-1,51927261	1,8961E-28
Respuesta a auxina	At5g57560	-1,62567273	1,8704E-22
Respuesta a auxina	At4g34750	-1,69267304	1,6599E-19
Respuesta a auxina	At4g32690	-1,72069722	1,1817E-23
Respuesta a auxina	At5g43700	-1,78244742	1,9775E-32
Respuesta a auxina	At5g63310	-1,78758622	1,1404E-36
Respuesta a auxina	At3g07390	-1,93141234	1,1956E-36
Respuesta a auxina	At2g14960	-1,93654842	1,3911E-10
Respuesta a auxina	At5g57420	-1,94238461	2,8697E-07
Respuesta a auxina	At1g70000	-1,97916652	6,194E-40
Respuesta a auxina	At1g01060	-2,07084147	4,5165E-64
Respuesta a auxina	At5g03310	-2,1400684	1,5451E-13
Respuesta a auxina	At1g75580	-2,33714383	3,4639E-30
Respuesta a auxina	At1g72430	-2,47469493	3,9327E-69
Respuesta a auxina	At2g06850	-2,68506921	4,7237E-42
Respuesta a auxina	At5g37770	-2,80836002	1,7146E-49
Respuesta a auxina	At5g54510	-2,80909089	1,2227E-55
Respuesta a auxina	At4g34810	-2,86252187	1,0782E-13
Respuesta a auxina	At2g04160	-2,88085467	9,5381E-30
Respuesta a auxina	At3g04730	-2,96872018	1,6213E-30
Respuesta a auxina	At4g34760	-3,08945147	3,2492E-48
Respuesta a auxina	At1g74660	-3,10396208	7,847E-09
Respuesta a auxina	At1g19830	-3,53612286	5,2052E-18
Respuesta a auxina	At4g34800	-3,66932086	4,3379E-23
Respuesta a auxina	At4g31320	-3,86832417	5,9445E-53
Respuesta a auxina	At4g34790	-3,99465035	5,049E-107
Respuesta a auxina	At2g16580	-4,14311606	8,26E-56
Respuesta a auxina	At5g66260	-5,29022281	6,157E-48
Transporte polar	At3g53480	-1,0188996	7,5997E-14
Transporte polar	At5g55910	-1,05328211	3,1671E-20
Transporte polar	At4g31820	-1,44300461	9,2381E-19
Transporte polar	At1g15690	-1,62175983	2,2037E-36
Transporte polar	At4g30960	-1,91819985	8,2098E-40
Transporte polar	At2g01420	-1,92755906	3,0124E-16
Transporte polar	At2g47000	-1,96283146	3,224E-38
Transporte polar	At1g70940	-2,07259265	1,0524E-39
Transporte polar	At1g73590	-2,11013568	1,0649E-57
Transporte polar	At2g38120	-2,54420621	4,75E-110
Transporte polar	At3g14370	-2,83178239	2,768E-14
Transporte polar	At5g57090	-2,87406992	1,3834E-63
Transporte polar	At1g23080	-3,09143573	1,3073E-73

At1g17520	Homeodomain-like/winged-helix DNA-binding family protein	1,44176274
At1g15050	IAA34	1,37744305
At5g06140	SNX1	1,26548165
At5g45710	HSFA4C	1,25124035
At3g63420	AGG1	1,23240434
At3g44300	NIT2	1,23167752
At4g28640	IAA11	1,13104576
At1g59870	ABCG36	1,1254531
At2g20120	COV1	1,11934843
At4g16420	ADA2B	1,08945315
At5g20990	CHL6	1,07851017
At4g18710	BIN2	1,06495579
At5g13930	CHS	1,06093967

Tabla Anexo 3.4.2.2.1.B. Meta-análisis de transcriptomas de genes Up-regulados en R (se resaltan en color los genes en común de los transcriptomas con los de esta tesis).

TOGNACCA (datos de esta tesis)			Ibarra et al. (2013)			Oh et al. (2009)			Shi et al. (2013)		
ATG	Gene_Alias	logFC	ATG	Gene_Alias	logFC	ATG	Gene_Alias	logFC	ATG	Gene_Alias	logFC
At1g01060	LHY	-2,07084147	AT1G05180	AXR1	1,503485758	AT1G04610	YUC3	1,70442	At1g23080	PIN7	2,77011
At1g05470	CVP2	-1,16240279	AT1G15690	AVP1	1,44371907	AT1G29430	SAUR62	2,29289	At1g29420	SAUR-like auxin-responsive protein family	1,42343
At1g15690	AVP1	-1,62175983	AT1G23080	PIN7	8,1746566	AT1G29440	SAUR63	1,93186	At1g70940	PIN3	1,34862
At1g19830	SAUR-like auxin-responsive protein family	-3,53612286	AT1G54990	AXR4	1,765785444	AT1G29450	SAUR64	1,66867	At1g73590	PIN1	1,83993
At1g23080	PIN7	-3,09143573	AT1G72320	APUM23	1,731041014	AT1G29460	SAUR65	2,78398	At1g75580	SAUR-like auxin-responsive protein family	2,24926
At1g29420	SAUR-like auxin-responsive protein family	-1,4955254	AT1G73590	PIN1	4,486739248	AT1G29500	SAUR66	2,09231	At2g06850	XTH4	5,1997
At1g70000	myb-like transcription factor family protein	-1,97916652	AT2G20610	SUR1	3,107316987	AT1G29510	SAUR67	1,61172	At2g16580	SAUR-like auxin-responsive protein family	3,26625
At1g70560	SAV3	-2,24832271	AT3G28345	ABCB15	5,421127568	AT1G52830	IAA6	2,5789	At2g20610	SUR1	1,8742
At1g70940	PIN3	-2,07259265	AT3G54640	TRP3	1,653419865	AT1G53700	PK3AT	2,17269	At2g38120	AUX1	1,51872
At1g72430	SAUR-like auxin-responsive protein family	-2,47469493	AT3G61830	ARF18	1,597902645	AT1G59500	GH3.4	2,7265	At2g42580	TTL3	2,26396
At1g73590	PIN1	-2,11013568	AT4G04950	GRXS17	1,619251039	AT1G69690	TCP15	1,65325	At3g04730	IAA16	2,40391
At1g74660	MIF1	-3,10396208	AT4G13750	EMB2597	3,057265009	AT1G70560	SAV3	1,56242	At3g07390	AIR12	1,86081
At1g75500	WAT1	-1,4802343	AT4G29140	ADP1	3,617669944	AT2G23170	GH3.3	2,51634	At4g31500	SUR2	2,69165
At1g75580	SAUR-like auxin-responsive protein family	-2,33714383	AT4G30960	CIPK6	2,641797368	AT2G34650	ABR	1,61425	At4g34750	SAUR-like auxin-responsive protein family	1,65787
At2g01420	PIN4	-1,92755906	AT4G31500	SUR2	1,973732892	AT2G46990	IAA20	1,86039	At4g34760	SAUR-like auxin-responsive protein family	2,74595
At2g04160	AIR3	-2,88085467	AT4G37580	COP3	5,091713866	AT2G47000	ABCB4	1,74487	At4g34790	SAUR-like auxin-responsive protein family	4,20464
At2g06850	XTH4	-2,68506921	AT5G54510	GH3.6	4,210361762	AT3G14370	WAG2	1,68743	At4g34800	SAUR-like auxin-responsive protein family	3,50163
At2g14960	GH3.1	-1,93654842	AT5G57090	PIN2	1,988835905	AT3G15540	IAA19	2,26548	At4g37580	COP3	2,58898
At2g16580	SAUR-like auxin-responsive protein family	-4,14311606				AT3G23030	IAA2	1,60761	At5g03310	SAUR-like auxin-responsive protein family	3,33266
At2g20610	SUR1	-1,21806192				AT3G42800		1,56539	At5g37770	CML24	2,22551
At2g34680	AIR9	-1,51927261				AT3G61830	ARF18	1,866	At5g43700	AUX2-11	1,20338

At2g37630	MYB91	-1,0595515
At2g38120	AUX1	-2,54420621
At2g42580	TTL3	-1,41861585
At2g46830	CCA1	-1,41088755
At2g47000	ABCB4	-1,96283146
At3g04730	IAA16	-2,96872018
At3g07390	AIR12	-1,93141234
At3g14370	WAG2	-2,83178239
At3g53480	ABCG37	-1,0188996
At4g30960	SNRK3.14	-1,91819985
At4g31320	SAUR-like auxin-responsive protein family	-3,86832417
At4g31500	SUR2	-2,79390318
At4g31820	ENP	-1,44300461
At4g32690	ATGLB3	-1,72069722
At4g34750	SAUR-like auxin-responsive protein family	-1,69267304
At4g34760	SAUR-like auxin-responsive protein family	-3,08945147
At4g34790	SAUR-like auxin-responsive protein family	-3,99465035
At4g34800	SAUR-like auxin-responsive protein family	-3,66932086
At4g34810	SAUR-like auxin-responsive protein family	-2,86252187
At4g37580	COP3	-1,22455049
At4g39950	CYP79B2	-3,35557106
At5g03310	SAUR-like auxin-responsive protein family	-2,1400684
At5g37770	CML24	-2,80836002
At5g43700	AUX2-11	-1,78244742
At5g54510	GH3.6	-2,80909089
At5g55910	D6PK	-1,05328211

AT4G16515	CLEL6	1,96811	At5g54510	GH3.6	2,53506
AT4G29140	ADP1	3,05002	At5g57090	PIN2	2,67376
AT4G32280	IAA29	2,4963			
AT4G37390	GH3-2	2,7265			
AT4G37580	COP3	3,47611			
AT5G03280	EIN2	1,5249			
AT5G18060	SAUR23	2,55089			
AT5G27780	SAUR75	2,29289			
AT5G47370	HAT2	1,70658			

At5g56660	ILL2	-1,01276111
At5g57090	PIN2	-2,87406992
At5g57420	IAA33	-1,94238461
At5g57560	XTH22	-1,62567273
At5g63310	NDPK IA	-1,78758622
At5g66260	SAUR-like auxin-responsive protein family	-5,29022281

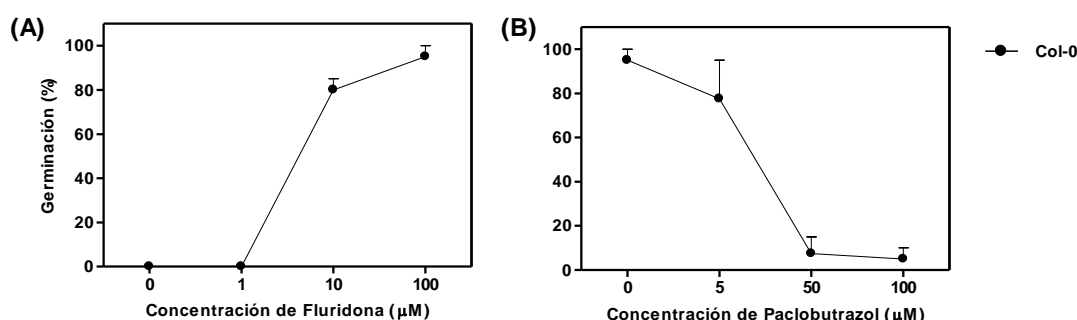
Tabla 3.4.1.4. Listado de *primers* utilizados para medir niveles de expresión por qRT-PCR.

GEN	Forward	Reverse
<i>ABI3</i>	CCGCCAACCTCGCAGTATAATC	CCTCCTCTGTCTCGCCATCC
<i>ABI5</i>	CAATCAACAACAAGCAGCAGCAG	CCACCACTAAAGACACCAACACC
<i>GA3ox1</i>	CTCTTCTCCGCTGCTCCTTC	CGCCGTGGTTTGAGATTTGG
<i>NCED9</i>	ATGCTTATCTGGCTTTAACCGAACC	CTCCGTCTTCTTCTCCGTCACC
<i>oligodT</i>	TTTTTTTTTTTTTTTT	
<i>PIL5</i>	TGAATCCCGTAGCGAGGAAACAA	TTCCACATCCCATTGACATCATCTG
<i>PP2A</i>	TAACGTGGCCAAAATGATGC	GTTCTCCACAACCGATTGGT
<i>SOMNUS</i>	TTTGCTCTTTTCGCCTTCCAC	TCGCCGTGAAATCGTTCATC

Fig. Anexo 3.4.1.1.1. Listado de los primeros 19 genes diferencialmente expresados por luz R, ordenados por logFC.

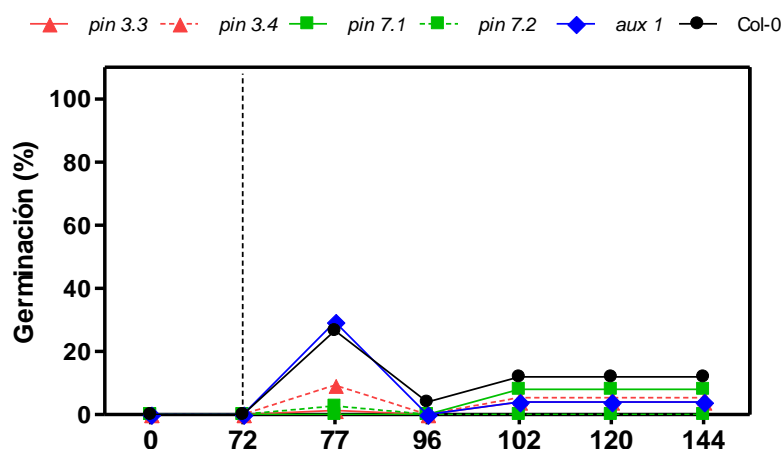
ATG	Nombre	logFC	Valor de P	gen.fdr	Coordenada del Gen	Comienzo	Fin
AT1G70860	AT1G70860	10,1044954	6,93E-07	1,52E-06	1:26718320-26718992	26718320	26718992
AT3G21352	AT3G21352	6,41112772	4,20E-28	3,56E-27	3:7519976-7520360	7519976	7520360
AT2G46970	PIL1	5,95733813	2,88E-115	5,60E-113	2:19295490-19297826	19295490	19297826
AT4G01970	STS	5,83171434	9,25E-230	3,13E-226	4:853922-857008	853922	857008
AT3G62090	PIL2	5,6214802	2,89E-290	4,90E-286	3:22988547-22990709	22988547	22990709
AT4G09590	NHL22	5,58722729	4,74E-69	2,06E-67	4:6066128-6066763	6066128	6066763
AT4G09610	GASA2	5,5653161	1,33E-95	1,49E-93	4:6074770-6075645	6074770	6075645
AT3G55240	AT3G55240	5,46592386	2,13E-43	3,52E-42	3:20473541-20474763	20473541	20474763
AT1G77960	AT1G77960	5,34854328	3,55E-244	1,50E-240	1:29310057-29313571	29310057	29313571
AT4G18690	AT4G18690	5,31322032	2,99E-259	1,69E-255	4:10282762-10283803	10282762	10283803
AT5G66580	AT5G66580	5,15717352	3,54E-208	8,56E-205	5:26572631-26573408	26572631	26573408
AT1G25310	MEE8	5,1083891	1,88E-262	1,59E-258	1:8874124-8874834	8874124	8874834
AT2G29310	AT2G29310	5,05566043	2,71E-30	2,55E-29	2:12590058-12591363	12590058	12591363
AT2G35970	AT2G35970	4,86681015	2,43E-21	1,44E-20	2:15109007-15109773	15109007	15109773
AT2G18050	HIS1-3	4,69387886	3,78E-198	8,00E-195	2:7845923-7846884	7845923	7846884
AT5G37240	AT5G37240	4,6294556	7,29E-14	2,72E-13	5:14737560-14739256	14737560	14739256
AT2G02930	ATGSTF3	4,58428061	7,62E-88	6,61E-86	2:851164-852222	851164	852222
AT4G16780	ATHB2	4,5740609	2,72E-215	7,68E-212	4:9449114-9450743	9449114	9450743
AT4G09600	GASA3	4,5454268	1,28E-108	2,08E-106	4:6072804-6073612	6072804	6073612

Fig. Anexo 3.4.1.3.1. Curva de respuesta a fluridona y paclobutrazol.



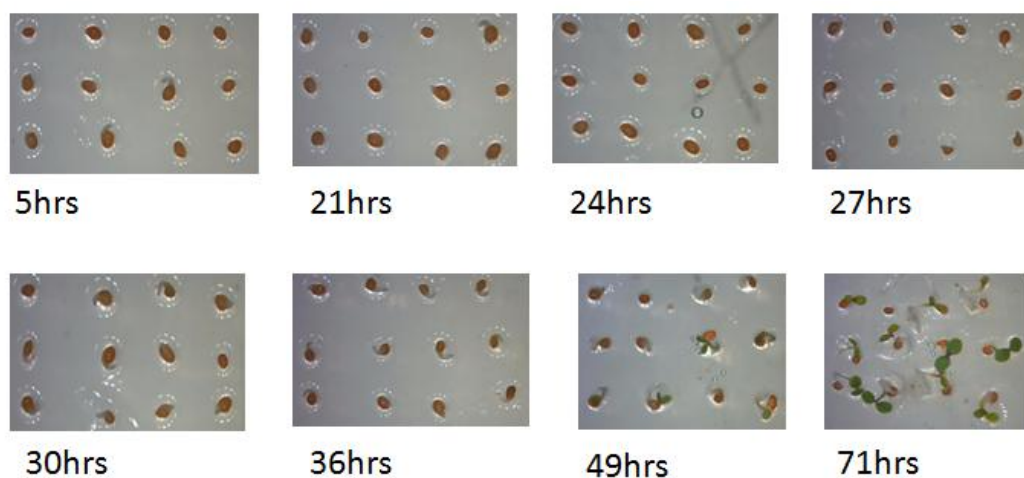
Germinación de semillas Col-0 embebidas en oscuridad a 5°C durante tres días, previos a pulso de luz. Las semillas se incubaron durante todo del tratamiento en presencia de soluciones de concentraciones crecientes de (A) Fluridona, inhibidor de síntesis endógena de ABA y (B) Paclobutrazol, inhibidor de síntesis endógena de GA. Se representa la media \pm ES (n=3).

Fig. Anexo 3.4.2.4.1. Efecto de la incubación prolongada con NPA sobre la germinación de las semillas.



Las semillas se incubaron durante 2 horas en oscuridad y luego se irradiaron con un pulso de RL (RLp). Luego se incubaron durante 3 días a 5°C y se irradiaron con un RLp. Finalizado el RLp se incubaron durante 3 días a 25°C, momento en el que se contó germinación. Se representa el porcentaje de germinación de las semillas en función a las horas de incubación en NPA 200 μM, que bloquea el transporte de auxinas. El medio de incubación se suplementó con NPA por períodos variables luego de la imbibición de las semillas (0 hs, 72 hs, 77 hs, 96 hs, 102 hs, 120 hs y 144 hs), manteniéndose un control en agua (0 hs) y un control en NPA (144 hs). Cada punto representa la media \pm ES (n=6).

Fig. Anexo 3.5.2. Cinética de germinación de semillas embebidas en agar-agua.



La figura indica los pasos que ocurren durante la inducción de la germinación en semillas Col-0, luego de la imbibición. La ruptura de la testa inicia entre las ~21 hs y 24 hs, y mientras que la ruptura del endosperma comienza ~27 hs.

ANEXOS CAPÍTULO 4.

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN LA INTEGRACIÓN DE SEÑALES
LUMÍNICAS Y TÉRMICAS EN LA GERMINACIÓN DE
SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*.**

Tabla 4.4.2.1. Listado de *primers* utilizados para medir niveles de expresión por qRT-PCR.

GEN	Forward	Reverse
<i>CYP707A2</i>	GAGAATGGGAGAGAAGAAGGAGGAC	GAGAAGCCAAGTTAAGACAGAAGCG
<i>EXP10</i>	CCTGGCTCAATCGTTGTAACCG	AGCAAGGTCAAAGTGTTCAAGAGG
<i>GA20ox3</i>	AGCACTCGCACCACATACC	CCACTTCCTCTGAGCCTTCTG
<i>GA3ox1</i>	CTCTTCTCCGCTGCTCCTTC	CGCCGTGGTTTGAGATTTGG
<i>GID1A</i>	GTGACGGTTAGAGACCGCGA	TCCCTCGGGTAAAAACGCTT
<i>NCED9</i>	ATGCTTATCTGGCTTTAACCGAACC	CTCCGTCTTCTTCTCCGTCACC
<i>oligodT</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTT	
<i>PP2A</i>	TAACGTGGCCAAAATGATGC	GTTCTCCACAACCGATTGGT
<i>PRR7</i>	ACTATGCACGGCTCCAAAAG	TCGTTGTCTGGTCTGTTTG
<i>TOC1</i>	TCTTCGCAGAATCCCTGTGAT	GCTGCACCTAGCTTCAAGCA